Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.rer.nat. A.M. Kellerer

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLZYKLUSPHASEN-SPEZIFISCHEN WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLEN UNTER IN-VIVO BEDINGUNGEN

Autoradiographische Untersuchungen mit einem Doppelmarkierungsverfahren mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin an den Kryptenzellen des Dünndarms der Maus

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Manfred Wolfgang Klein
aus Aschaffenburg

Würzburg, den 31. Januar 1980

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.rer.nat. A.M. Kellerer

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLZYKLUSPHASEN-SPEZIFISCHEN WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLEN UNTER IN-VIVO BEDINGUNGEN

Autoradiographische Untersuchungen mit einem Doppelmarkierungsverfahren mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin an den Kryptenzellen des Dünndarms der Maus

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Manfred Wolfgang Klein
aus Aschaffenburg

Würzburg, den 31. Januar 1980

Referent:	Professor Dr.med. B. Maurer-Schultze
Korreferent:	Professor Dr.med. W. Bohndorf
Dekan:	Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meinen Eltern und Brüdern

und

meiner Frau Elisabeth

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0067

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN 4

I. Tiermaterial 4

II. Radioaktive Substanzen 4

III. Bestrahlungsbedingungen 4

IV. Histologische Aufarbeitung des Dünndarmes 5

V. Quetschen der Dünndarmkrypten 6

VI. Herstellung der Doppelschichtautoradiogramme . 7

1. Dünne Emulsionsschicht 8

2. Zwischenschicht 11

3. Dicke Emulsionsschicht 11

VII. Auswertung der Doppelschichtautoradiogramme .. 12

1. Bestimmung des Nulleffekts 12

2. Festlegung der Zählgrenze zwischen unmarkierten und ^{3}H-markierten Interphasezellen . 13

3. Festlegung der Zählgrenze zwischen rein ^{14}C- und doppelmarkierten Interphasezellen . 13

4. Festlegung der Zählgrenzen für Mitosen und Pyknosen 14

5. Ausgewertete Parameter 16

5.1. Interphasezellen 17
5.2. Mitosen 17
5.3. Pyknosen 17

VIII. Methode der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin 17

1. Prinzip der Methode 17

Seite

2. Vorteile dieser Methode der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin für eine in-vivo Untersuchung der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus 18

3. Anwendung der Methode auf die vorgegebene Fragestellung 21

C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE 22

I. Versuchsdurchführung 22

II. Ergebnisse 24

1. Zahl der unterschiedlich markierten Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 24

1.1. Rein ^{3}H-markierte Subpopulation 24
1.2. Doppelmarkierte Subpopulation 26
1.3. Rein ^{14}C-markierte Subpopulation 28
1.4. Unmarkierte Subpopulation 29

2. Gesamtzahl der Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 32

3. Mittlere Zellzahl pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 32

4. Zahl der unterschiedlich markierten Pyknosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 34

5. Zahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 36

D. DISKUSSION 39

I. In-vivo Untersuchung der Zellzyklusphasenspezifischen Wirkung ionisierender Strahlen mit Hilfe der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin 39

II. Strahlendosis 41

III. Verwendung der Gesamtzellzahl pro Krypte als Bezugsgröße für die Zahl der Mitosen und Pyknosen nach der Bestrahlung 42

Seite

IV. Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, gemessen an der Mitoseverzögerung 43

1. Zellen in der G_2-Phase (rein ^{3}H-markierte Zellen) 44

1.1. Mitoseverzögerung 45
1.2. Mitoseverlust 46
1.3. Verhalten der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen nach der Bestrahlung 48

2. Zellen in der S-Phase (doppelmarkierte Zellen) 49

3. Zellen in der frühen S-Phase (rein ^{14}C-markierte Zellen) 51

4. Zellen in der G_1-Phase (unmarkierte Zellen) 52

5. Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Literatur 53

5.1. In-vitro Untersuchungen 53
5.2. In-vivo Untersuchungen 55

V. Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, gemessen am Auftreten von Pyknosen 59

1. Probleme bei der Beurteilung der Pyknosewerte 59

2. Auftreten von Pyknosen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung 61

2.1. Gesamtzahl der Pyknosen pro Krypte . 61
2.2. Rein ^{3}H-markierte Pyknosen 61
2.3. Doppelmarkierte Pyknosen 63
2.4. Rein ^{14}C- und unmarkierte Pyknosen . 63

. ZUSAMMENFASSUNG 65

ITERATURVERZEICHNIS ..... I - VII

A. EINLEITUNG

Die Bestrahlung von Tumoren ist in der Reihenfolge der Wahl nach der chirurgischen Therapie und in vielen Fällen noch vor einer zytostatischen Therapie ein sehr wichtiges Instrument bei der Behandlung Tumorkranker. Wenn eine radikale chirurgische Therapie nicht oder nicht mehr möglich ist, ist die Bestrahlung bei einer umschriebenen Tumorerkrankung das Mittel der Wahl. Gegenüber der systemischen Therapie mit Zytostatika ist die örtliche Bestrahlung von Tumoren weniger toxisch.

Neben der Tatsache, daß im allgemeinen proliferierende Zellen strahlenempfindlicher sind als nicht-proliferierende, ist die Empfindlichkeit der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus gegenüber Röntgenstrahlen ebenfalls unterschiedlich. Für eine Kombination mit Zytostatika, aber auch ganz generell ist es von Interesse, die Zellzyklusphasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen zu kennen. Hinweise auf eine solche Zellzyklusphasen-spezifische Wirkung gibt es schon seit langem (SPEAR et al., 1938).

Für eine Untersuchung der Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung von Röntgenstrahlen sind synchronisierte Zellpopulationen erforderlich. Nur bei synchronisierten Zellen kann die Bestrahlung in einer bestimmten Zellzyklusphase vorgenommen werden. Zunächst wurde die Phasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen an Monolayer-Kulturen von Zellen und an Zellsuspensionen untersucht (Übersicht bei SINCLAIR, 1968; TOLMACH et al., 1971). Dabei zeigte sich, daß die Reaktion der Zellen auf Röntgenstrahlen eine Summation von verschiedenen Schädigungsarten ist, deren Sensibilitätsspektren nicht vergleichbar sind, da sie unterschiedliche Zellorganellen und biochemische Zustände betreffen. SINCLAIR (1968) zählt zu diesen Schädigungsarten u.a. die Pyknose, Chromosomenaberrationen, die Mitoseverzögerung und die verminderte Fähigkeit strahlengeschädigter Zellen, Kolonien zu bilden.

Wird die Mitoseverzögerung von Zellen nach einer Bestrahlung betrachtet, so findet SINCLAIR (1968) in-vitro die Zellen in der frühen S-Phase und in der Mitose am empfindlichsten. In-vitro Untersuchungen von TOLMACH und Mitarbeitern (1971) zeigen dagegen eine zunehmende Empfindlichkeit von der G_1-Phase bis zur Mitose.

Eine Untersuchung der Zellzyklusphasen-spezifischen Strahlensensibilität der Zellen unter in-vivo Bedingungen ist sehr schwierig, da eine in-vivo Synchronisation von Zellen nicht möglich ist. Eine Möglichkeit, die Phasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen in-vivo zu untersuchen, bietet die Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen mit ^{3}H-Thymidin.

LESHER und Mitarbeiter haben sich seit den sechziger Jahren dieser Methode einer einmaligen Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin zur Untersuchung der Strahlensensibilität von Dünndarmkryptenepithelzellen der Maus bedient (LESHER, 1966b, 1967b; LESHER et al., 1966a, 1967a, 1968, 1970, 1974, 1975). Nach der Bestrahlung mit 300 R γ-^{60}Cobalt hat LESHER (1967b) den Eintritt der kurz vor der Bestrahlung mit ^{3}H-Thymidin markierten Dünndarmepithelzellen in die Mitose mit der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve (PLM-Kurve) gemessen. Verglichen mit der PLM-Kurve unbestrahlter Tiere, findet LESHER eine Mitoseverzögerung von umgerechnet 0.5 - 0.8 Minuten pro rd für die Zellen, die er in der S-Phase bestrahlte.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Doppelmarkierungsmethode mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin angewendet, d.h. eine Methode, die zu einer wesentlich schärferen Unterscheidung der Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus führt. Mit dieser Methode ist auch in-vivo eine sogenannte "Pseudo"-Synchronisation der Zellen möglich. Durch die Injektion von ^{3}H- und ^{14}C-markiertem Thymidin im Abstand von 1 Stunde können zwei scharf begrenzte Subpopulationen erzeugt werden, eine rein ^{3}H-markierte Subpopulation in der G_2- und eine rein ^{14}C-markierte Subpopulation in der frühen S-Phase, deren Zellen jeweils einen Altersunterschied von maximal 1 Stunde auf-

weisen. Die restlichen Zellen in der S-Phase sind doppelmarkiert, die Zellen in der G_1-Phase sind unmarkiert. Diese unterschiedlich markierten Zellen können mit Hilfe der Doppelschichtautoradiographie unterschieden werden.

Die Wirkung einer Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 200 rd auf die Dünndarmkryptenzellen der Maus, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befanden, wurde anhand der Mitoseverzögerung der unterschiedlich markierten Zellpopulationen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden, mit einer Mitoseverzögerung von 0.8 - 1.2 Minuten pro rd am empfindlichsten reagierten. Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase waren, wiesen eine Mitoseverzögerung von 0.5 - 0.6 Minuten pro rd auf.

Abgesehen von der unterschiedlichen Mitoseverzögerung der Zellen, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus bestrahlt wurden, wurde auch eine vermehrte Zahl von Pyknosen der Dünndarmkryptenzellen nach der Ganzkörperbestrahlung mit 200 rd gefunden. Dabei zeigten sich zwei verschiedene Mechanismen der Pyknoseentstehung. Wurden die Zellen in der mittleren S- bis zur G_2-Phase bestrahlt, so entstanden die Pyknosen erst mit dem Eintritt der strahlengeschädigten Zellen in die Teilungsphase. Bei der Bestrahlung in der G_1- und der frühen S-Phase hingegen war kein Zusammenhang der Pyknoseentstehung mit der Teilungsphase zu beobachten.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Tiermaterial

Für die Versuche wurden insgesamt 38 männliche weiße Mäuse des Inzuchtstammes NMRI (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden) mit einem mittleren Gewicht von 30 $\pm$ 2,5 g verwendet. Vier, höchstens fünf Tiere wurden in einem 16 x 22 cm großen Makrolonkäfig bei einer Temperatur von 23 ^{o}C und einem zwölfstündigen Hell - Dunkel - Wechsel (6^{oo} - 18^{oo} Uhr gehalten. Als Nahrung erhielten die Tiere die Standarddiät ALTROMIN^{R} und Wasser ad libitum.

II. Radioaktive Substanzen

Die radioaktiven Substanzen ^{3}H-Thymidin (^{3}H-TdR, Thymidin-Methyl-^{3}H, spezifische Aktivität von 6700 mCi/mM) und ^{14}C-Thymidin (^{14}C-TdR, Thymidin-2-^{14}C, spezifische Aktivität 64.8 mCi/mM) wurden von New England Nuclear Chemicals, Boston/USA bezogen. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Substanzen im Kühlschrank bei 4 ^{o}C gelagert.

III. Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlungsversuche wurden mit einer Röntgenanlage vom Typ MG 300 der Firma C.H.F. Müller AG in Hamburg, bestückt mit einer 300 kV-Röntgenröhre derselben Firma, durchgeführt.

In Vorversuchen wurde das Bestrahlungsfeld vermessen. Bei einer Probebestrahlung mit 250 kV, 10 mA, 60 cm Fokus-Herd-Abstand und einer Stärke des Kupferfilters von 0.5 mm betrug der Dosisabfall in 7.5 cm Entfernung vom Zentralstrahl 5 %.

Dieser Wert wurde bei der Konstruktion der Bestrahlungskäfige berücksichtigt. Die zu bestrahlenden Tiere sollten innerhalb des durch diesen Wert begrenzten Gebietes liegen. Auf einer Plexiglasgrundplatte von 12 x 15 cm, die fest mit dem Bestrahlungstisch verbunden war, befanden sich zwei Vertiefungen in einem Abstand von 1 cm. Diese Vertiefungen entsprechen dem 4 x 8 cm messenden Grundriß der Bestrahlungskäfige aus Plastik (Höhe der Käfige 4 cm, Dicke des Plexiglases 0.7 cm).

In der Mitte der die Käfige trennenden Leiste war eine Mikroschlauchkammer zur Dosismessung befestigt (Physikalisch-technische Werkstätten Dr. Pychlau, Freiburg, Typ 16489, zugehöriges Dosimeter Typ Duplex 225). Eine weitere Ionisationsmeßkammer befand sich seitlich in 10 cm Entfernung vom Zentralstrahl der Röntgenanlage (Philips Typ 37486, zugehöriges Dosimeter Typ 37471-SPX-65.2D). Mit diesen beiden Meßkammern wurde die vorgegebene Grenze des Dosisabfalls ($\pm$ 5 %) auch während der einzelnen Bestrahlungen fortlaufend kontrolliert.

Bei den Bestrahlungsversuchen wurden die Tiere mit 250 kV, 9 mA, 50 cm Fokus-Herdabstand und einem Kupferfilter von 0.5 mm Dicke 3.9 Minuten bei einer durchschnittlichen Dosisleistung von 56 R pro Minute bestrahlt. Dies entspricht einer applizierten Dosis von 219 R oder rund 200 rd.

Die Kontrolltiere wurden einer Scheinbestrahlung unterzogen, d.h. sie wurden genauso lange in den engen Bestrahlungskäfigen gehalten wie die bestrahlten Tiere. Dadurch sollten sie den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt werden. Dies beinhaltet auch eine möglicherweise auftretende Streßwirkung durch die relativ engen Bestrahlungskäfige.

IV. Histologische Aufarbeitung des Dünndarmes

Zur histologischen Aufarbeitung des Dünndarmes wurden die Darmstücke sofort nach der Entnahme für mindestens 24 Stun-

den in einer Mischung von 96 %iger Essigsäure und absolutem Alkohol (1 : 3), dem kaltes Thymidin (0.1 mg/ml) zugesetzt war, fixiert.

Danach wurden die ganzen Darmstücke nach FEULGEN gefärbt. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Därme je 5 Minuten in 96 %, 70 %, 50 % und 30 %igen Alkohol überführt, zweimal mit Aqua bidest. gespült und anschließend einer Säurehydrolyse in 1n-HCl bei 60 °C unterzogen. Nach 6 Minuten wurde diese Reaktion durch ein kurzes Eintauchen in Aqua bidest. gestoppt. Daraufhin erfolgte die Färbung der Därme in SCHIFFschem Reagenz (0.5 g Pararosanilin, 70 ml Aqua dest., 7 ml 1n-HCl, 0.5 g Kaliumdisulfit). Schließlich wurden die Därme dreimal mit Leitungswasser und dann nochmals zwei- bis dreimal mit Aqua bidest. abgespült.

Die gefärbten Darmstücke wurden bis zum Quetschen in 45 %iger Essigsäure aufbewahrt. Sollten die Därme erst später gequetscht werden, so wurden sie in 45 %iger Essigsäure bei -20 °C gelagert. Lagerungszeiten über 2 Monate wurden vermieden, da dann das Quetschen erfahrungsgemäß Schwierigkeiten bereitet.

V. Quetschen der Dünndarmkrypten

Die Quetschtechnik der Dünndarmkrypten wurde zuerst von WIMBER und Mitarbeitern 1960 beschrieben. Für die vorliegende Arbeit wurde eine modifizierte Methode verwendet, wie sie von HAACK (1971) angegeben wurde.

Ein kleines Stück Dünndarm wurde mit einem Tropfen 45 %iger Essigsäure auf einen Objektträger gegeben. Unter dem Stereomikroskop wurde mit Hilfe zweier Insektenpräpariernadeln eine einzelne Krypte aus ihrem Gewebeverband gelöst. Mit einer feinen Mikropipette wurde diese Krypte mit einem Tropfen 45 %iger Essigsäure auf einen weiteren staub- und fettfreien Objektträger übertragen. Auf der Unterseite

dieses Objektträgers war vorher ein Kreis mit etwa 0.5 cm Durchmesser mit dem Diamantschreiber eingeritzt worden. Die Krypte wurde in die Mitte dieses Kreises gebracht. Unter Kontrolle im Stereomikroskop wurde nun ein 12 x 12 mm großes Deckglas langsam und vorsichtig auf den Essigsäuretropfen mit der darin befindlichen Krypte gelegt und mit mäßigem Druck durch zwei Präpariernadeln auf den Objektträger gepreßt. Hatte der Tropfen die richtige Größe, so befanden sich die Zellkerne der gequetschten Krypte in gewünschter Weise innerhalb des vorgezeichneten Kreises. Dabei sollte der Abstand zweier Kerne für die Doppelschichtautoradiographie mindestens zwei Kerndurchmesser betragen.

Der Objektträger wurde dann sofort auf Trockeneis gelegt. Sobald sich unter dem Deckglasrand die ersten Luftblasen einzogen, wurde das Deckglas mit Hilfe einer Rasierklinge abgesprengt. Mikroskopische Kontrollen der Deckgläser zeigten, daß in den überwiegenden Fällen keine oder in seltenen Fällen 1 - 2 Kerne am Deckglas haften blieben.

Um das Abschwemmen der Zellkerne vom Objektträger zu verhindern, wurden die Objektträger nach dem Absprengen des Deckglases kurz in Chromalaungelatine eingetaucht (0.5 %ige Gelatine und 0.05 %iges Chromalaun $\left[KCr(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O\right]$ in Aqua bidest.). Das Chromalaun sollte den Bakterienbefall der Gelatine vermeiden.

Die Präparate wurden bei Zimmertemperatur staubfrei getrocknet und bis zur Filmbeschichtung im Kühlschrank aufbewahrt.

VI. Herstellung der Doppelschichtautoradiogramme

Bei der Doppelschichtautoradiographie werden nacheinander auf einen Objektträger zwei photographische Emulsionen aufgebracht, die durch eine inerte Zwischenschicht getrennt werden. Auf Grund der verschiedenen Energie und der dadurch be-

dingten unterschiedlichen Reichweite der ^{3}H- und ^{14}C-ß-Teilchen wird die unterschiedliche Markierung in beiden Filmschichten des entwickelten Autoradiogrammes sichtbar gemacht. Während die ^{3}H-ß-Teilchen auf Grund ihrer geringen mittleren Reichweite (1 - 2 µ) nur in der ersten photographischen Schicht Silberkörner erzeugen, können die ^{14}C-ß-Teilchen (mittlere Reichweite von 30 µ) durch die inerte Schicht vordringen. Ihre Bahnen sind hier nach der Entwicklung der dicken Emulsionsschicht anhand der Silberkornspuren zu erkennen (Abb. 1a, S. 9 und 1b, S. 10).

1. Dünne Emulsionsschicht

Für die Herstellung der dünnen Schicht wurde die ILFORD-Emulsion K_2 (Durchmesser der Silberbromidkristalle 0.2 µ) verwendet. Sie wurde in einem Wasserbad bei 42 °C geschmolzen, mit Aqua bidest. im Verhältnis 2 : 1 verdünnt und danach durch eine doppelte Mullschicht filtriert. In die konstant bei 42 °C gehaltene Emulsion wurden die Objektträger getaucht (Dipping-Methode) und anschließend zum Trocknen senkrecht in einen Ständer gestellt.

Wenn die Objektträger nach etwa 2 Stunden getrocknet waren, wurden sie zur Exposition in speziellen, lichtdichten Expositionskästchen mit einem Trockenmittel (DRIERITE) im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Durch Entwicklung von Probe-Autoradiogrammen nach verschiedenen Expositionszeiten wurden 4 Tage als optimale Expositionszeit für die erste Schicht ermittelt.

Nach der Exposition wurden die Autoradiogramme 4 Minuten in einer frisch angesetzten und filtrierten Amidollösung entwickelt (Amidol 1.35 g, 5.4 g Na_2SO_3 p.a. wasserfrei, 2.4 ml KBr 10 %ig, Aqua bidest. 300 ml). Danach wurden die Autoradiogramme 10 Minuten in 30 %iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und anschließend 20 Minuten unter fließendem Wasser gewässert. Zur Vermeidung von Kalkniederschlägen wur-

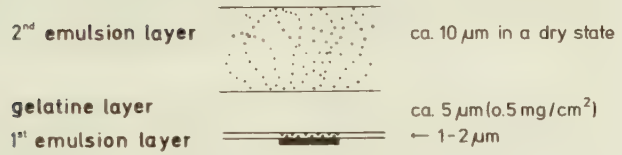


Abb. 1a: Schematische Darstellung eines Doppelschicht-autoradiogramms im Querschnitt.

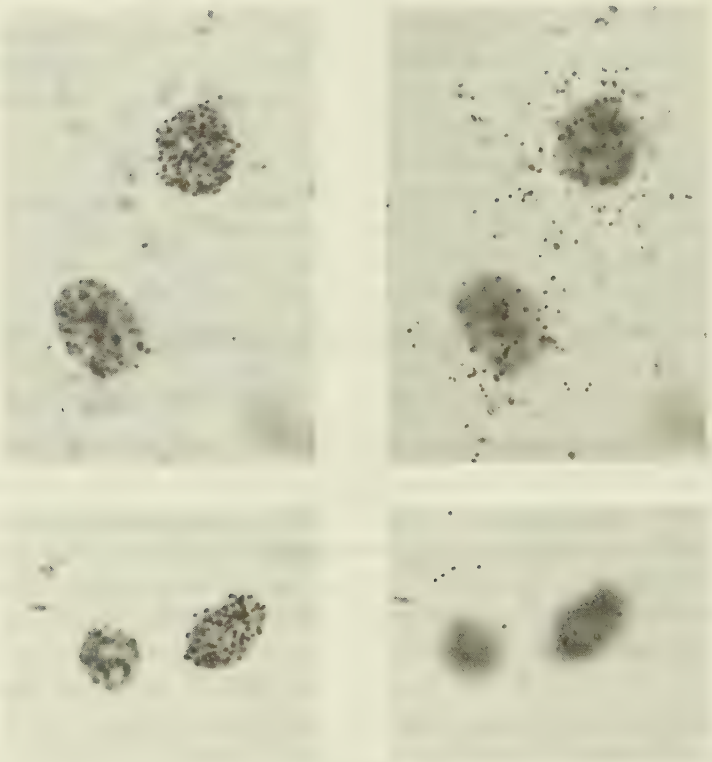


Abb. 1b: Doppelschichtautoradiogramm von einem Krypten-quetschpräparat nach Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

linke Seite: auf die dünne Schicht fokussiert
rechte Seite: auf die dicke Schicht fokussiert

oben: doppelmarkierter Kern (viele Körner in der dünnen, Spuren in der dicken Schicht)

Mitte: rein ^{14}C-markierter Kern (wenige, falsche Körner in der dünnen, Spuren in der dicken Schicht)

unten: links unmarkierter Kern (keine Körner in der dünnen, keine Spuren in der dicken Schicht), rechts davon ein rein ^{3}H-markierter Kern (viele Körner in der dünnen, keine Spuren in der dicken Schicht)

den die Autoradiogramme dann mit Aqua bidest. abgespült und staubfrei getrocknet.

Die entwickelte dünne Schicht hat im trockenen Zustand eine Dicke von 1 ± 0.5 µ.

2. Zwischenschicht

Eine 10 %ige Gelatinelösung wurde bei 42 °C geschmolzen, danach auf 28 °C abgekühlt und konstant bei dieser Temperatur in einem Wasserbad gehalten. In diese Lösung und bei dieser Temperatur wurden die oben beschriebenen Autoradiogramme mit der entwickelten dünnen Schicht langsam und vorsichtig eingetaucht und in gleicher Weise wieder aus der Lösung gezogen.

Die so mit Gelatine beschichteten Autoradiogramme wurden 10 Stunden lang getrocknet, danach 20 Minuten in einer Formalinlösung (1 : 4) gehärtet, 10 Minuten gewässert und dann kurz mit Aqua bidest. abgespült. Die Dicke der Gelatineschicht betrug nach dem Trocknen 5.0 ± 1.0 µ. Die Zwischenschicht ist also dick genug, um auch die ^{3}H-ß-Teilchen mit der größten Reichweite von 5 µ zu absorbieren. Somit können die ^{3}H-ß-Teilchen die zweite Emulsionsschicht nicht erreichen.

3. Dicke Emulsionsschicht

Für die zweite photographische Schicht wurde ebenfalls die bei 42 °C geschmolzene und filtrierte K_2-Emulsion von ILFORD - nun jedoch unverdünnt - verwendet. Auf einer PVC-Platte wurden 5 Autoradiogramme, die oben und unten von je einem Leerobjektträger begrenzt wurden, seitlich etwa 1 cm vom Objektträgerrand entfernt mit je einem Wäscheband (0.5 cm breit, 1 mm dick) befestigt. Nun wurde etwa 1 ml der Emulsion auf den oberen, leeren Objektträger getropft und diese mit einem sauberen Glasstab ohne abzusetzen bis zum untersten Objektträger ausgestrichen. Kurze Zeit später wur-

den die Wäschebänder entfernt und die Autoradiogramme auf Holzbänkchen in horizontaler Lage 4 - 5 Stunden lang getrocknet. Danach wurden die Autoradiogramme in den gleichen lichtdichten Expositionskästchen und unter gleichen Bedingungen wie unter B.VI.1. beschrieben 20 Tage lang bei -20 °C exponiert.

Wegen der Dicke der Emulsionsschicht ist eine gleichmäßige Entwicklung schwieriger. Das Durchdringen des Entwicklers durch die dicke Emulsionsschicht benötigt längere Zeit. Um zu verhindern, daß die oberen Schichten der Emulsion schon entwickelt sind, während der Entwickler die unteren Schichten noch nicht penetriert hat, wird mit einer verdünnten Amidollösung (2.25 g Amidol, 9.0 g Na_2SO_3 p.a. wasserfrei, 17.5 g Borsäure, 4.0 ml KBr 10 %ig, Aqua bidest. ad 1000 ml) während einer auf 20 Minuten verlängerten Zeit und bei einer auf 12 °C erniedrigten Temperatur entwickelt. Der 50 Minuten dauernden Fixierung schloß sich ein 90 Minuten langes Wässern unter fließendem Wasser an. Danach wurden die Autoradiogramme mit Aqua bidest. abgespült, getrocknet, mit einem Deckglas unter Verwendung von ENTELLAN eingedeckt und anschließend beschriftet.

Die entwickelte dicke Schicht hat im trockenen Zustand eine Dicke von ca. 20 µ.

VII. Auswertung der Doppelschichtautoradiogramme

1. Bestimmung des Nulleffekts

Um markierte von unmarkierten Kernen zu unterscheiden, muß zuerst der Nulleffekt bestimmt werden. Unter dem Begriff "Nulleffekt" werden die Silberkörner verstanden, die nicht durch die radioaktive Markierung entstanden sind. Ein gewisser Nulleffekt ist unvermeidlich und entsteht schon bei der Herstellung der photographischen Emulsion. Eine Erhöhung

dieses Nulleffektes kann durch Umgebungsstrahlung, falsche Lagerung der Emulsionen oder deren mechanische Zerrung beim Verarbeiten bedingt sein. Weitere Gründe sind zu hohe Temperaturen beim Exponieren und Entwickeln der Autoradiogramme. Ein Großteil dieser Fehlerquellen kann jedoch durch sorgfältige und sachgemäße Handhabung vermieden werden.

Der Nulleffekt der Emulsion, d.h. die durchschnittliche Kornzahl pro unmarkiertem Kern, lag bei 0.3 Körnern pro Kern.

2. Festlegung der Zählgrenze zwischen unmarkierten und ^{3}H-markierten Interphasezellen

Zur Bestimmung der Kornzahl pro Kern, von der ab ein Kern als ^{3}H-markiert bezeichnet werden kann, wurden in einem Autoradiogramm einer gequetschten Krypte die Körner über allen Kernen ausgezählt. Auf diese Weise konnte eine Häufigkeitsverteilungskurve der Körner pro Kern ermittelt werden. Von Null bis zu wenigen Körnern pro Kern fiel ihre Zahl steil ab, um dann bei zunehmender Kornzahl pro Kern wieder zu einem relativ breiten Maximum anzusteigen. Die mittlere Kornzahl pro Kern betrug 45 Körner. Die Extrapolation des steilen Abfalls auf die Abszisse ergibt mit nur geringem Fehler die Kornzahl pro Kern, bis zu der ein Kern als unmarkiert gelten kann. Sie lag bei den vorliegenden Versuchen bei 2 Körnern pro Kern. Alle Kerne mit 3 und mehr Körnern pro Kern wurden als ^{3}H-markiert gewertet. Wie die Häufigkeitsverteilungskurve der Kornzahl pro Kern zeigt, ist der Zählfehler, der sich aus der Überschneidung der Kornverteilungskurven der unmarkierten und der ^{3}H-markierten Kerne ergibt, gering.

3. Festlegung der Zählgrenze zwischen rein ^{14}C- und doppelmarkierten Interphasezellen

Bei der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin ist die Festlegung der Zählgrenze zwischen rein ^{14}C- und dop-

pelmarkierten Kernen für die quantitative Unterscheidung dieser beiden Markierungen von entscheidender Bedeutung. Da die ^{14}C-ß-Teilchen während der Exposition der 1. Schicht auch die erste dünne Emulsionsschicht durchdringen, erzeugen sie dort ebenso wie die ^{3}H-ß-Teilchen Körner. Die Zahl dieser sogenannten "falschen" Silberkörner, die von den ^{14}C-ß-Teilchen herrühren (siehe Abb. 1b, S. 10), muß zur Unterscheidung der rein ^{14}C-markierten von den doppelmarkierten Kernen ermittelt werden.

Zu diesem Zweck erhielten 2 Tiere nur ^{14}C-Thymidin in der auch bei den Doppelmarkierungsversuchen injizierten Dosis von 0.13 µCi pro g Körpergewicht der Mäuse. Auf den entwickelten Doppelschichtautoradiogrammen wurden die Silberkörner in der 1. Schicht über denjenigen Kernen ausgezählt, die in der 2. Schicht Spuren der ^{14}C-ß-Teilchen aufwiesen.

Abb. 2 (S. 15) gibt ein Beispiel einer so ermittelten Verteilungskurve wieder. Danach können bis zu 13 Körnern pro Kern von der ^{14}C-Markierung herrühren. Bei der Auswertung der Autoradiogramme wurden daher Kerne mit Spuren in der 2. Schicht und einer Kornzahl pro Kern von $\geq$ 13 Körnern in der 1. Schicht als doppelmarkiert, darunter als rein ^{14}C-markiert gezählt. Bei einer mittleren Kornzahl von ca. 45 Körnern in der 1. Schicht pro doppelmarkierte Interphasezelle ist der Fehler nur gering, wenn Kerne mit einer schwachen Markierung in der 1. Schicht fälschlich als rein ^{14}C-markiert gezählt werden.

4. Festlegung der Zählgrenzen für Mitosen und Pyknosen

Mitosen und Pyknosen zeigen im Vergleich zu den Interphasezellen geringere Kornzahlen pro Kern, da hier wegen des dichteren Kernmaterials die Beta-Selbstabsorption größer ist. Diese Vergrößerung der Beta-Selbstabsorption infolge der Kondensation des Chromatins und der stärker abgerundeten Form von Mitosen und Pyknosen kann sehr unterschiedlich sein. Auch ist wegen dieser abgerundeten Form

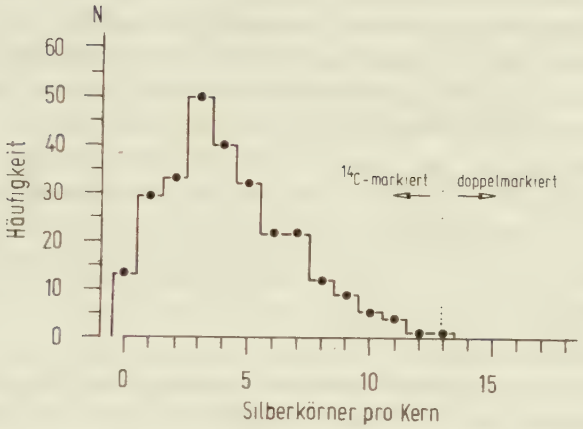


Abb. 2: Häufigkeitsverteilungskurve der Kornzahl pro Kern in der ersten Emulsionsschicht (sog. falsche Silberkörner) nach Gabe von 0.13 µCi ^{14}C-Thymidin pro g Körpergewicht

Diese Verteilung bezieht sich nur auf ^{14}C-markierte Kerne, d.h. Kerne, die Spuren in der dicken Schicht aufweisen.

Wie die Häufigkeitsverteilung zeigt, können bis zu 13 Körner pro Kern durch die ^{14}C-Markierung bedingt sein. Kerne mit 13 und mehr Körnern in der dünnen Schicht wurden als doppelmarkiert gezählt.

von Mitosen und Pyknosen die Emulsionsschicht über diesen mehr kugeligen Gebilden offensichtlich dünner, was zu einer weiteren Verringerung der Kornzahl pro Mitose oder Pyknose führt. Infolgedessen ist eine getrennte Ermittlung der Zählgrenzen für Mitosen und Pyknosen erforderlich. Erfahrungsgemäß wurden Mitosen oder Pyknosen mit keiner Spur in der dicken und bis zu einem Korn in der dünnen Schicht als unmarkiert, mit mehr als einem Korn in der dünnen Schicht als rein ^{3}H-markiert gezählt. Die mittlere Kornzahl pro Mitose oder Pyknose lag bei rund 40 Körnern. Die Zählgrenze zwischen den rein ^{14}C-markierten und den doppelmarkierten Mitosen oder Pyknosen lag zwischen 9 und 10 Körnern pro Mitose oder Pyknose in der dünnen und Spuren in der dicken Schicht.

5. Ausgewertete Parameter

Die Autoradiogramme wurden teilweise von zwei Personen ausgewertet. Darüber hinaus wurden dieselben Autoradiogramme von derselben Person nach einer gewissen Zeit nochmals ausgezählt. Der Unterschied zwischen vergleichbaren Zählungen war bei den Zellzahlen pro Krypte geringer als 10 %, bei den Mitosen geringer als 5 %. Bei den Pyknosen besteht die Schwierigkeit, daß Kernfragmente durch das Quetschen auseinandergesprengt werden. In diesen Fällen ist eine quantitative Auswertung schwierig und deshalb unsicher. Bei wenigen Tieren (in der 10. und 12. Stunde) wurde deshalb auf eine Auswertung der Pyknosen verzichtet.

Da der erste Beobachtungspunkt der vorliegenden Arbeit bei zwei Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung liegt, ist eine Aussage über den Kurvenverlauf der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere hier nicht möglich. Diese Werte konnten jedoch aus den Untersuchungen von BURHOLT, SCHULTZE und MAURER (1973) entnommen werden. Von diesen Autoren war das Auftreten der rein ^{3}H-markierten Mitosen innerhalb der ersten beiden Stunden nach Gabe von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin registriert worden.

5.1. Interphasezellen

Zu allen Versuchszeitpunkten wurde die Gesamtzahl aller in der Krypte enthaltenen Zellen ermittelt.

Neben der Gesamtzellzahl pro Krypte wurde auch die Anzahl der einzelnen, unterschiedlich markierten Interphasezellen pro Krypte bestimmt. Dies erfolgte jedoch nur bei den bestrahlten Tieren zu den Untersuchungszeitpunkten 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung.

5.2. Mitosen

Zu allen Versuchszeitpunkten wurde die Gesamtzahl der Mitosen pro Krypte erfaßt. Als Mitose galten alle gut erkennbaren Teilungsstadien von später Pro- bis zur Telophase.

Weiter wurden die Mitosen zu allen Versuchszeitpunkten getrennt nach ihrer unterschiedlichen Markierung registriert.

5.3. Pyknosen

Neben den Interphasezellen und den Mitosen wurde auch die Gesamtzahl der Pyknosen pro Krypte sowie die Zahl der unterschiedlich markierten Pyknosen pro Krypte bestimmt. Dabei gab es nicht unbeträchtliche histologische Klassifizierungsschwierigkeiten, da die Pyknosen beim Quetschen offensichtlich in kleinere Fragmente zerteilt werden können. Als Pyknosen wurden chromatindichte, homogen gefärbte, runde Körper oder abgerundete Fragmenthaufen von mindestens 4 - 5 µ Gesamtdurchmesser gezählt.

VIII. Methode der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

1. Prinzip der Methode

Bei dem hier angewendeten Doppelmarkierungsverfahren

(SCHULTZE et al., 1976) erhielten die Tiere zum Zeitpunkt Null des Versuches eine erste Injektion von ^{3}H-Thymidin und eine Stunde später eine zweite Injektion von ^{14}C-Thymidin.

Durch die erste Injektion von ^{3}H-Thymidin werden alle Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden, ^{3}H-markiert. Während des Zeitintervalls von einer Stunde zwischen den Injektionen verläßt ein Teil der ^{3}H-markierten Zellen die S-Phase und tritt in die G_2-Phase über. Während desselben Zeitintervalls treten unmarkierte Zellen aus der G_1-Phase neu in die S-Phase ein. Durch die zweite Injektion von ^{14}C-Thymidin werden alle Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden, ^{14}C-markiert.

Durch diese Doppelmarkierungsmethode entstehen drei unterschiedlich markierte Subpopulationen. 1. Die rein ^{3}H-markierten Zellen, die nach der ersten Injektion die S-Phase verlassen haben. 2. Die rein ^{14}C-markierten Zellen, die zwischen den beiden Injektionen neu in die S-Phase eingetreten sind. 3. Die doppelmarkierten Zellen, die sich zu beiden Injektionszeitpunkten in der S-Phase befinden. Abb. 3 (S. 19) stellt den Zusammenhang nochmals graphisch dar.

2. Vorteile dieser Methode der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin für eine in-vivo Untersuchung der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus

Um den Einfluß von Röntgenstrahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zu untersuchen, sind grundsätzlich synchronisierte Zellpopulationen erforderlich. Bisher ist eine Synchronisation von Zellen nur unter in-vitro Bedingungen, d.h. in Zellkulturen möglich. Eine in-vivo Synchronisation von Zellen konnte dagegen bisher nicht erreicht werden (vgl. Abschn. D.I.). Das oben beschriebene Verfahren der Doppelmarkierung ermöglicht jedoch sozusagen eine Pseudosynchronisation von Zellen unter in-vivo

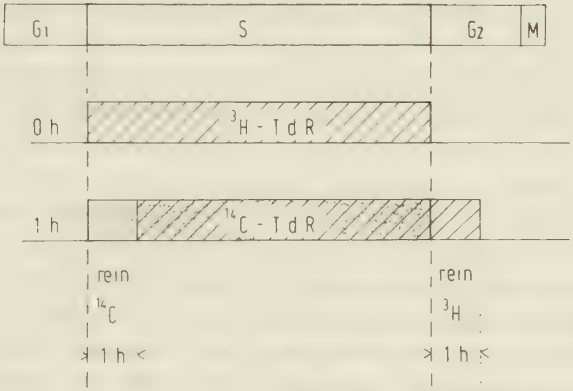


Abb. 3: Schema der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

Lage der drei unterschiedlich markierten Subpopulationen innerhalb des Zellzyklus nach Injektion von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin im Abstand von einer Stunde.

Bedingungen. Das Doppelmarkierungsverfahren führt nämlich zu scharf begrenzten Subpopulationen unterschiedlich markierter Zellen, deren Verhalten bei der Passage durch den Zellzyklus mit Hilfe der Doppelschichtautoradiographie verfolgt werden kann.

Der große Vorteil der Methode liegt in der Verwendung des physiologischen DNA-Vorläufers Thymidin in unterschiedlich markierter Form. Dies führt zu den scharf begrenzten Subpopulationen unterschiedlich markierter Zellen. Die für die Doppelmarkierung verwendete Radioaktivität (3.3 µCi ^{3}H- und 0.13 µCi ^{14}C-Thymidin pro g Körpergewicht der Tiere) dürfte innerhalb des kurzen Beobachtungsintervalls von 12 Stunden keinen für die Auswertung der Ergebnisse bedeutenden Strahlenschaden hervorrufen. Im Gegensatz zur Synchronisation mit chemischen Mitteln bleibt darüber hinaus beim Doppelmarkierungsverfahren mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin der Zellfluß durch den Zyklus ungestört. Das Schicksal der unterschiedlich markierten Subpopulationen kann unabhängig voneinander untersucht werden. Im vorliegenden Versuch wurden schmale Subpopulationen rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen mit einer maximalen Altersdifferenz von 1 Stunde erzeugt. Eine so scharfe Synchronisation ist nicht einmal unter in-vitro Bedingungen bei Zellkulturen möglich.

Weiter kann die Position unterschiedlich markierter Zellen innerhalb des Zellzyklus zu späteren Zeitpunkten bestimmt werden. Am Ende der Doppelmarkierung befindet sich die rein ^{14}C-markierte Population am Anfang der S-Phase, die rein ^{3}H-markierten Zellen füllen die G_2-Phase aus, und die doppelmarkierten Zellen liegen in der S-Phase abzüglich der ersten Stunde. Je nach Zeitintervall zwischen dem Beginn der Doppelmarkierung und dem Beobachtungszeitpunkt oder dem Zeitpunkt der Bestrahlung kann bei der Methode der Doppelmarkierung auf Grund der bekannten zellkinetischen Parameter der Kryptenzellen im Jejunum der Maus die Position der einzelnen Subpopulationen innerhalb des Zellzyklus zu diesen Zeitpunk-

ten bestimmt werden. Im vorliegenden Fall lag die rein ^{3}H-markierte Population zum Zeitpunkt der Bestrahlung (1 Stunde 20 Minuten nach Beginn der Doppelmarkierung) zu zwei Dritteln in der G_2-Phase, der Rest befand sich schon in der Mitose. Die rein ^{14}C-markierten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt am Anfang der S-Phase. Die doppelmarkierten Zellen lagen in der S-Phase und zu einem geringen Teil (5 %) im ersten Drittel der G_2-Phase (vgl. linke Seite der Abb. 4, S. 27). Dies gilt natürlich nur für einen unveränderten Zellfluß. Der Zellfluß sollte sich aber bis zur Bestrahlung keinesfalls verändert haben.

3. Anwendung der Methode auf die vorgegebene Fragestellung

Nach der oben beschriebenen Doppelmarkierungsmethode wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Doppelschichtautoradiographie die Zellzyklusphasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Zellen der Dünndarmkrypten der Maus untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Auftreten der unterschiedlich markierten Mitosen und Pyknosen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung mit 200 rd Ganzkörperbestrahlung gemessen. Die so gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen unbestrahlter Kontrolltiere verglichen. Die auftretenden Unterschiede erlauben Rückschlüsse auf eine Phasen-spezifische Wirkung ionisierender Strahlen.

C. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

I. Versuchsdurchführung

Kurz vor Versuchsbeginn um 8^{00} Uhr wurden 38 Versuchstiere gewogen und in verschiedene Gruppen eingeteilt. 23 Tiere waren einer Bestrahlungsgruppe, 13 Tiere einer Kontrollgruppe zugeordnet. Zwei Tiere erhielten nur ^{14}C-Thymidin und dienten zur Bestimmung der falschen Kornzahlen pro Kern, die durch die ^{14}C-ß-Teilchen in der 1. Schicht verursacht werden (vgl. Abschnitt B.VII.3.).

Den Tieren wurde zuerst 3.3 µCi ^{3}H-Thymidin pro g Körpergewicht in 0.3 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert. Eine Stunde später erfolgte die ^{14}C-Thymidin-Injektion (0.13 µCi pro g Körpergewicht in 0.2 ml physiologischer Kochsalzlösung, i.p.).

Im Bestrahlungsraum wurden die Tiere beider Gruppen 5 Minuten vor Beginn der Bestrahlung bzw. der Scheinbestrahlung in die Bestrahlungskäfige gesetzt. Die Tiere der Bestrahlungsgruppe wurden genau 20 Minuten nach der ^{14}C-Injektion unter den in Abschnitt B.III. angegebenen Bedingungen bestrahlt. Die Kontrolltiere wurden unter identischen Umständen einer Scheinbestrahlung unterworfen.

Die Wahl des Bestrahlungszeitpunktes hing von zwei zeitlich gegenläufigen Bedingungen ab. Erstens muß die für den Einbau des ^{14}C-Thymidins in die DNA nötige Zeit (Verfügbarkeitszeit) zur Verfügung stehen. Zweitens soll jedoch sobald als möglich nach der Doppelmarkierung bestrahlt werden, damit sich die rein ^{3}H-markierten Zellen noch zum größten Teil in der G_2-Phase befinden, und nur wenige bereits in die Mitose eingetreten sind. Der gewählte Zeitraum von 20 Minuten erfüllt beide Forderungen in etwa, da in diesem Zeitintervall 80 % des angebotenen ^{14}C-Thymidins in die DNA eingebaut sind (CARMONA et al., in Vorbereitung), und sich andererseits

die rein ^{3}H-markierte Population noch zu zwei Dritteln in der G_2-Phase befindet. Nur wenige rein ^{3}H-markierte Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der Mitose sind, haben bei einer Mitosedauer von 0.5 Stunden (SCHULTZE et al., 1972) die Teilung vollendet.

Der Wahl der Tötungszeitpunkte lagen folgende Gesichtspunkte zugrunde: Aus früheren Untersuchungen war das Verhalten der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere bekannt (BURHOLT et al., 1973). Darüber hinaus konnte aus den von SCHULTZE und Mitarbeitern (1972) veröffentlichten Daten der Verlauf der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve für die unterschiedlich markierten Subpopulationen der Kontrolltiere abgeleitet werden. Es wurden nun solche Zeitpunkte als Tötungs- und damit Beobachtungszeitpunkt ausgewählt, die das zu erwartende An- und Absteigen der entsprechenden Mitosewellen der unterschiedlich markierten Zellpopulationen möglichst gut erfassen konnten.

In der Bestrahlungsgruppe wurden 2 - 3 Tiere zwischen der 2. und 8. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung stündlich und danach bis zur 12. Stunde im Abstand von 2 Stunden getötet. In der Kontrollgruppe erfolgte die Tötung von ebenfalls 2 - 3 Tieren pro Beobachtungszeitpunkt in der 3., 4., 7., 8., 10. und 12. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Luxation der Wirbelsäule getötet. Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte durch einen transversalen Schnitt. 6 cm distal des Pylorus wurde ein etwa 3 cm langes Stück Dünndarm entnommen und sofort in das bereitstehende gekühlte Fixationsmittel gegeben.

Abgesehen von einem Tier aus der 5-Stunden-Bestrahlungsgruppe, das ein blutig tingiertes Peritoneum aufwies, konnte bei der Sektion der Tiere kein pathologischer Befund erhoben werden.

Die histologische und autoradiographische Weiterverarbeitung erfolgte, wie in den Abschnitten B.IV. - VI. beschrieben wurde.

II. Ergebnisse

1. Zahl der unterschiedlich markierten Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

1.1. Rein ^{3}H-markierte Subpopulation

Wie in Abb. 4.1. (S. 27) auf der linken Seite schematisch dargestellt ist, befindet sich die rein ^{3}H-markierte Subpopulation zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu zwei Dritteln in der G_2-Phase und zu einem Drittel schon in der Mitose. Auf der rechten Seite der Abb. 4.1. ist die Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen, bezogen auf alle Zellen der Krypte, als Funktion der Zeit nach Beginn der Doppelmarkierung aufgetragen. Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist in Abb. 4 mit "Rö" bezeichnet. Die Punkte und die durchgezogene Kurve geben die Werte für die bestrahlten Tiere, die Kreise und die grobgestrichelte Kurve die der Kontrolltiere wieder.

Zum Zeitpunkt 2 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung - dem ersten Beobachtungspunkt in der vorliegenden Arbeit - können bei den bestrahlten Tieren nur vereinzelt Mitosen in den Krypten beobachtet werden. Die Kurve rein ^{3}H-markierter Mitosen steigt von diesem Punkt aus langsam an und erreicht ungefähr bei 4.5 Stunden ein Maximum, das aber nur einem Zehntel des Maximalwertes der Kontrollpopulation entspricht. Die Kurve fällt nach der 5. Stunde ab. Jedoch finden sich noch vereinzelt rein ^{3}H-markierte Mitosen bis zur 10. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung. Diese Meßpunkte sind jedoch von den entsprechenden Werten der Kontrollpopulation statistisch nicht abzusichern.

Die in Abb. 4.1. (S. 27) grobgestrichelte Kurve der Kontrolltiere wurde der Arbeit von BURHOLT und Mitarbeitern (1973) entnommen. Die einzelnen Werte dieser Kurve von BURHOLT wurden lediglich vom Prozentsatz der rein ^{3}H-markierten Mitosen, bezogen auf alle Mitosen, auf rein ^{3}H-markierte Mitosen, bezogen auf alle Zellen in der Krypte, umgerechnet

(vgl. Abschn. B.VII.5.1.). Die ersten eigenen Werte der Kontrolltiere wurden in der 3. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung gemessen und stimmen gut mit den Werten von BURHOLT überein. Wie die Werte zeigen, beträgt die Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen bei unbestrahlten Tieren 1 Stunde und 20 Minuten nach Beginn der Doppelmarkierung bereits ca. 5 Mitosen pro Krypte. Die Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen erreicht zwischen 1.7 und 2 Stunden ein Maximum von ca. 6 Mitosen pro Krypte und fällt in der 3. Stunde fast bis auf Null ab. Die Fläche unter der von BURHOLT und Mitarbeitern (1973) gemessenen Kurve des Prozentsatzes rein ^{3}H-markierter Mitosen beträgt 1 Stunde, wie dies bei einer einstündigen Zeitdifferenz zwischen den beiden Injektionen von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin auch zu erwarten ist.

Der Anstieg der rein ^{3}H-markierten Mitosen pro Krypte beginnt bei den bestrahlten Tieren später, und im Gegensatz zu den Kontrolltieren ist die Kurve erheblich breiter. Wird das Zeitintervall zwischen dem Maximum der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere und dem breiten, flachen Maximum der rein ^{3}H-markierten Mitosen, das man für die bestrahlten Tiere erhält, wenn die durchgezogene Kurve nach 7 Stunden auf den Nullpunkt der Abszisse verlängert wird, als Maß für die Mitoseverzögerung genommen, so errechnet sich eine mittlere Mitoseverzögerung von ca. 2.7 Stunden oder 0.8 Minuten pro rd. Dieser Wert berücksichtigt jedoch nicht diejenigen rein ^{3}H-markierten Mitosen der bestrahlten Tiere, die in geringer Zahl zwischen der 6. und 12. Stunde registriert werden. Diese Mitosen sollten aber auch in die Ermittlung der mittleren Mitoseverzögerung miteinbezogen werden. Zu diesem Zweck wurde die Fläche unter der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der bestrahlten Tiere bestimmt und mit der Fläche unter der Kurve der Kontrolltiere verglichen. Dabei wäre bei der Berechnung der Fläche unter der Kurve der bestrahlten Tiere die übliche planimetrische Bestimmung zu ungenau. Rein formal läßt sich die Gesamtfläche jedoch aus den ungeglätte-

ten Einzelflächen über den gemittelten Werten der Beobachtungspunkte errechnen. Auf eine Glättung der Flächen wurde verzichtet, da eine interpolierte Kurve über den schwankenden Einzelwerten einen zusätzlichen Fehler beinhalten würde. Der Mittelwert der so errechneten Gesamtfläche kann zum Maximum der Kurve der Kontrolltiere in Beziehung gesetzt werden. Dadurch ergibt sich der obere Grenzwert der mittleren Mitoseverzögerung für diejenigen Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden. Dieser Wert liegt bei 4 Stunden oder 1.2 Minuten pro rd.

1.2. Doppelmarkierte Subpopulation

Die doppelmarkierte Subpopulation befindet sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase (vgl. linke Seite der Abb. 4.2., S. 27). Nur ein ganz geringer Teil dieser Subpopulation (ca. 5 %) ist im Zeitintervall zwischen der ^{14}C-Thymidin-Injektion und der Bestrahlung in die G_2-Phase übergetreten. Wie Abb. 4.2. (rechte Seite) zeigt, treten die ersten doppelmarkierten Mitosen der bestrahlten Tiere in der 4. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung auf. Nach einer weiteren Stunde erreicht die Kurve den Maximalwert. Bei einer Breite von 7 Stunden für die doppelmarkierte Subpopulation ist nach dem Erreichen des Maximalwertes der doppelmarkierten Mitosen mit einem mehrstündigen Plateau der Kurve zu rechnen. Bei den starken Schwankungen der gemessenen Werte ist dieses Plateau nicht eindeutig ausgebildet. Um dennoch eine Flächenberechnung durchführen zu können, bieten sich zwei Möglichkeiten an. Zum einen kann der Mittelwert aller gemessenen Werte zwischen der 5. und 9. Stunde - dem eindeutigen Anstieg, bzw. Abfall der Kurve - als Plateauwert in die Kurve eingezeichnet werden. Die Fläche unter dieser Kurve kann nun planimetrisch bestimmt werden. Eine solche Kurve ist in Abb. 4.2. eingezeichnet. Die Fläche unter dieser Kurve beträgt 4.25 Stunden. Zum anderen kann - wie bei der rein ^3H-markierten Subpopulation schon beschrieben - die Gesamtfläche

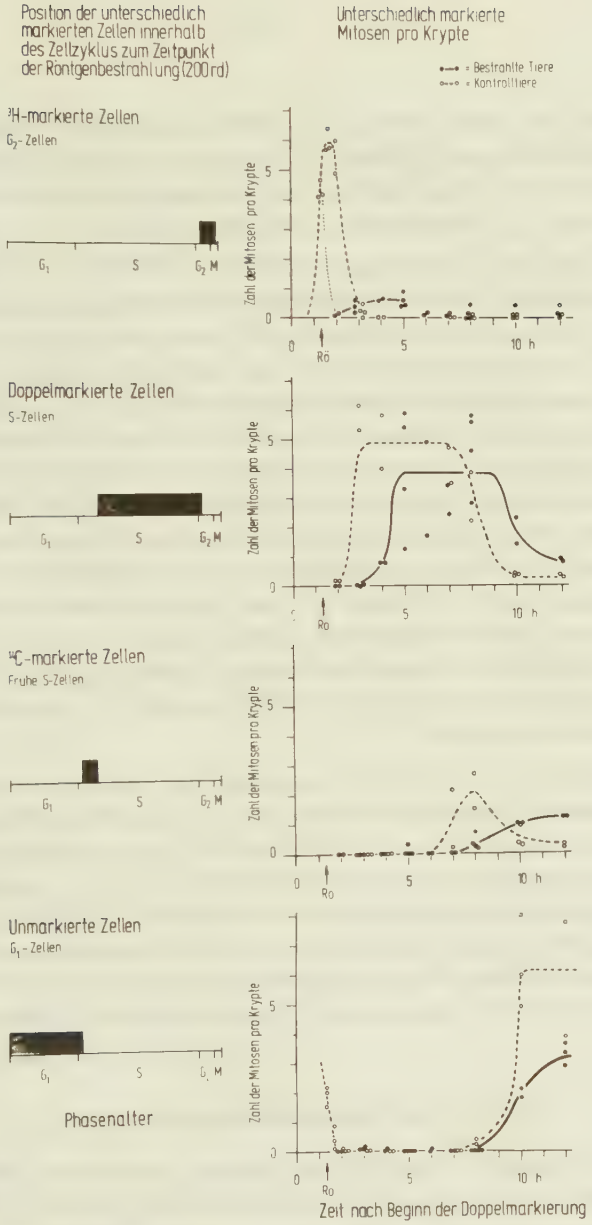


Abb. 4: Zahl der unterschiedlich markierten Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

Kreise und grobgestrichelte Kurve entsprechen den unbestrahlten Kontrolltieren, die Punkte und die durchgezogene Kurve den bestrahlten Tieren.

auch aus den ungeglätteten Einzelflächen über den gemessenen Werten bestimmt werden. Die auf diese Weise berechnete Fläche beträgt 4.5 Stunden, der Mittelwert dieser Fläche liegt bei 7.5 Stunden nach Versuchsbeginn.

Bei der Kontrollgruppe hingegen treten die ersten doppelmarkierten Mitosen 2 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung auf. Nach dem Anstieg der doppelmarkierten Mitosen in der 3. Stunde ist wie bei den bestrahlten Zellen mit einem mehrstündigen Plateau zu rechnen. Das in Abb. 4.2. (S. 27) eingezeichnete Plateau in der Kurve der Kontrolltiere ergibt sich aus den Mittelwerten aller doppelmarkierten Mitosezahlen pro Krypte zwischen der 3. und der 7. Stunde. Nach der 7. Stunde fällt die Kurve bis zur 10. Stunde fast bis auf Null ab. Auf Grund der zellkinetischen Parameter sollte die Fläche unter der Kurve entsprechend der Breite der doppelmarkierten Subpopulation 7 Stunden betragen. Die formale Berechnung dieser Fläche ergibt 6.1 Stunden, der Mittelwert dieser Fläche liegt bei 5.5 Stunden nach Versuchsbeginn.

Wird das Zeitintervall zwischen den 50 %-Werten der ansteigenden Schenkel der Mitosekurven von bestrahlten und unbestrahlten Tieren als Maß für die Mitoseverzögerung von Zellen genommen, die in der S-Phase bestrahlt wurden, so beträgt diese mittlere Mitoseverzögerung 1.6 Stunden oder 0.5 Minuten pro rd. Wird dagegen die Verschiebung des Mittelwertes beider Flächen zu Grunde gelegt, so beträgt die mittlere Mitoseverzögerung 2 Stunden oder 0.6 Minuten pro rd.

1.3. Rein ^{14}C-markierte Subpopulation

Die Zellen der rein ^{14}C-markierten Population befinden sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S-Phase (vgl. linke Seite der Abb. 4.3., S. 27). Abb. 4.3. zeigt, daß die ersten rein ^{14}C-markierten Mitosen der bestrahlten

Tiere in der 8. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung auftreten. Es folgt ein langsamer Anstieg der Mitosezahl bis ans Ende des Beobachtungsintervalls. Der Beobachtungszeitraum reicht jedoch nicht aus, das vollständige Durchlaufen der bestrahlten Population durch die Mitose zu verfolgen.

Die gestrichelte Kurve in der Abb. 4.3. (rechte Seite) gibt das Verhalten der rein ^{14}C-markierten Mitosen der Kontrolltiere wieder. Die ersten Mitosen treten in der 7. Stunde nach Versuchsbeginn auf. Das Maximum der Kurve wird in der 8. Stunde erreicht. Im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen von SCHULTZE und Mitarbeitern (1979) an Kryptenzellen des Dünndarms der Maus treten die rein ^{14}C-markierten Mitosen der Kontrolltiere im vorliegenden Versuch zu früh auf. Wie die Untersuchung von SCHULTZE und Mitarbeitern zeigte, sollte das Maximum der ^{14}C-markierten Zellen zwischen der 9. und der 10. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung liegen. Die Fläche unter der Kurve entspricht in etwa der Fläche der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere.

Die rein ^{14}C-markierten Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S-Phase befanden, treten im Vergleich zu den Kontrollen verzögert in die Mitose ein. Eine Mitoseverzögerung ist selbst dann vorhanden, wenn das Maximum der Kurve der Kontrolltiere zwischen der 9. und 10. Stunde liegen würde. Auf quantitative Aussagen wird wegen des nicht ausreichenden Beobachtungszeitraumes und des nicht zu erklärenden, zu frühen Auftretens des Mitosemaximums der Kontrolltiere verzichtet.

1.4. Unmarkierte Subpopulation

Die Zellen der unmarkierten Subpopulation liegen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G_1-Phase (vgl. linke Seite der Abb. 4.4., S. 27). Zu einem geringen Teil sind die Zellen schon in die S-Phase eingetreten. Wie in Abb. 4.4. dargestellt ist, treten die Mitosen der bestrahlten Tiere

Behandlung (K = Kontrolltiere Rö = bestrahlte Tiere)	Tötungszeitpunkt nach Erstinjektion (in Stunden)	Anzahl der Krypten	Gesamtzellzahl	mittlere Zellzahl pro Krypten	unmarkiert
Rö	2	15 13	4880 1484	325 314	0 0
Rö	3	19 20 20	4718 6167 6550	248 308 327	3 1 1
K	3	8 9	2250 3117	281 346	0 0
Rö	4	25 14	7516 3890	301 278	2 0
K	4	8 14	2461 4432	273 316	0 0
Rö	5	12 8 19 10	2590 2782 5425 2974	216 348 285 297	0 0 0 0
Rö	6	10 11	2816 2589	282 235	0 1
Rö	7	20 14	5659 4255	283 304	0 0
K	7	6 8	2639 2284	377 286	0 0
Rö	8	16 9 7 10	3696 2833 2039 3139	231 315 291 314	0 0 1 0
K	8	9 10	2993 2806	333 281	2 4
Rö	10	11 9	2599 3048	236 339	20 19
K	10	6 8 8	2118 2753 2190	353 344 274	48 48 39
Rö	12	9 12	2288 3615	253 301	33 35
K	12	11 7	3423 2109	311 301	43 54
		429	125.727		354

Mitosen				Pyknosen				
^{3}H-markiert	^{14}C-markiert	doppelmarkiert	Summe	unmarkiert	^{3}H-markiert	^{14}C-markiert	doppelmarkiert	Summe
1	0	0	1	2	5	0	3	10
2	0	0	2	0	4	0	8	12
3	0	1	7	3	4	0	4	11
13	0	1	15	1	3	0	3	7
8	0	0	9	4	11	2	13	30
0	0	49	49	0	0	0	0	0
2	0	48	50	1	1	0	0	2
16	0	17	35	24	11	21	59	115
9	0	11	20	2	10	1	70	83
0	0	51	51	0	0	0	2	2
0	0	56	56	0	0	0	4	4
5	0	15	20	14	18	16	33	81
7	2	47	56	5	3	1	5	14
8	0	62	70	11	2	4	24	41
6	0	54	60	3	2	0	4	9
1	0	49	50	1	2	6	9	18
2	0	19	22	10	1	6	10	27
3	0	39	42	3	19	4	29	55
1	0	48	49	21	5	4	28	58
0	17	33	50	1	3	0	4	8
0	1	28	29	2	0	0	3	5
0	11	38	49	1	0	7	45	53
2	2	52	56	2	9	1	12	24
1	6	38	46	4	1	6	5	16
0	5	44	49	2	4	5	10	21
1	21	28	52	0	0	0	1	1
0	32	17	53	1	0	6	0	7
0	13	17	50					
4	14	18	55	3	1	5	10	19
0	2	2	52					
1	3	3	55					
1	9	1	50	0	4	0	6	10
0	12	6	51					
2	17	8	62	3	2	6	7	18
5	4	4	56					
1	1	2	58	0	0	0	6	6
105	172	906	1537	124	125	101	417	767

Tabelle 1: Zusammenstellung des Zahlenmaterials aller ausgewerteten

10 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung auf. Verglichen mit den unmarkierten Mitosen der Kontrolltiere, treten die Zellen nach der Bestrahlung ungefähr zum gleichen Zeitpunkt in die Teilungsphase ein. Dagegen unterscheiden sich die Kurven in ihrer Höhe. Die Kurve der unmarkierten Mitosen erreicht bei den bestrahlten Tieren nur ungefähr die Hälfte der Höhe der Kurve der nicht bestrahlten Tiere. Die weitere Zunahme der Zahl der Mitosen von denjenigen Zellen, die in der G_1-Phase bestrahlt wurden, erscheint verlangsamt.

Bei dieser unmarkierten Subpopulation wird bei den bestrahlten, wie auch den unbestrahlten Tieren im gewählten Beobachtungsintervall nur der Anfang der Mitosekurve beobachtet. Quantitative Aussagen können deswegen auch bei dieser Subpopulation nicht getroffen werden.

2. Gesamtzahl der Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

Abb. 5 (S. 33) gibt die Gesamtzahl der Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung wieder. Zwei Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung (40 Minuten nach der Bestrahlung) beträgt die Mitosezahl pro Krypte praktisch Null. Danach steigt die Anzahl der Mitosen langsam an und erreicht zwischen 5 und 8 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung (3 - 6 Stunden nach der Bestrahlung) wieder den Normalbereich der Kontrolltiere.

3. Mittlere Zellzahl pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

Die mittlere Zellzahl pro Krypte beträgt 318 Zellen und bleibt, wie in Abb. 6 (S. 33) dargestellt, über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg weitgehend konstant. Die mittlere Zellzahl pro Krypte bei den bestrahlten Tieren weicht nur in geringem Maße von der der Kontrolltiere ab.

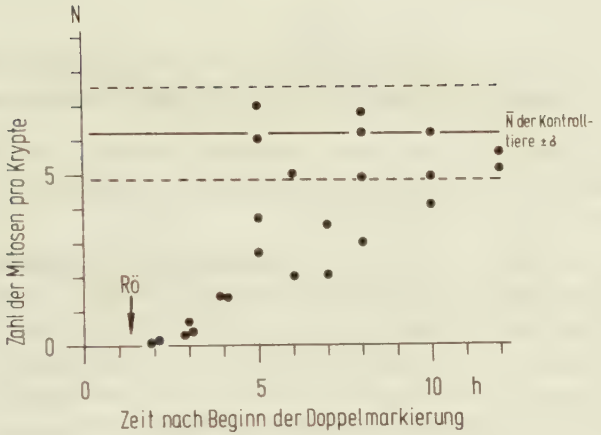


Abb. 5: Gesamtzahl der Mitosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

Die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert aller Mitosen pro Krypte bei den Kontrolltieren an. Die gestrichelten Linien liegen im Abstand ± δ zu diesem Mittelwert.

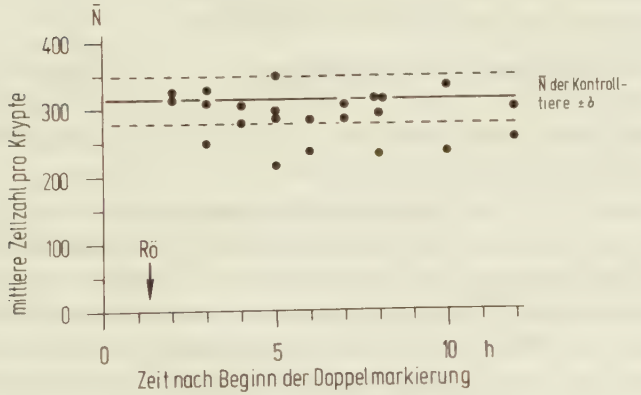


Abb. 6: Mittlere Zellzahl pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

Die durchgezogene Linie gibt den Mittelwert der Zellzahlen pro Krypte bei den Kontrolltieren wieder. Die gestrichelten Linien liegen in einem Abstand von ± δ zu diesem Mittelwert.

4. Zahl der unterschiedlich markierten Pyknosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

Aus Abb. 7 (S. 35) kann entnommen werden, daß die Zahl der Pyknosen pro Krypte während der Versuchszeit stark streut.

Die in Abb. 7.1. (S. 35) aufgetragene Gesamtzahl der Pyknosen pro Krypte bei den bestrahlten (Punkte) und den unbestrahlten Tieren (Kreise) läßt lediglich den Schluß zu, daß in den auf die Bestrahlung folgenden 6 - 8 Stunden die Zahl der Pyknosen pro Krypte im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht ist. Allerdings treten auch einige Pyknosen bei den unbestrahlten Kontrolltieren auf. Normalerweise werden immer einige Pyknosen im Dünndarmepithel der Maus gefunden.

Die Zahl der rein ^{3}H-markierten Pyknosen der bestrahlten Tiere (Punkte in Abb. 7.2., S. 35) steigt von der 2. Stunde nach Versuchsbeginn an, ist zwischen der 5. und 8. Stunde erhöht und fällt dann bis zur 10. Stunde wieder ab. Die Pyknosezahl pro Krypte liegt bei den bestrahlten Tieren durchweg höher als bei den Kontrolltieren.

Die doppelmarkierten Pyknosen der bestrahlten Tiere (Punkte in Abb. 7.3., S. 35) sind von der 4. bis zur 8. Stunde nach Versuchsbeginn gegenüber den entsprechenden Werten der Kontrolltiere erhöht.

Abb. 7.4. (S. 35) zeigt das Verhalten der rein ^{14}C-markierten Pyknosen. Bei den bestrahlten Tieren findet sich eine geringe Erhöhung der Zahl der rein ^{14}C-markierten Pyknosen zwischen der 5. und 8. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung. Wird dies mit der Kurve der rein ^{14}C-markierten Mitosen (vgl. Abb. 4.3., S. 27) verglichen, so ergibt sich, daß die Pyknosen mehrere Stunden vor Eintritt dieser Subpopulation in die Mitose auftreten.

Ein ähnliches Verhalten kennzeichnet die unmarkierten Pyknosen der bestrahlten Tiere (Abb. 7.5., S. 35). Noch vor dem Auftreten unmarkierter Mitosen (vgl. Abb. 4.4., S. 27)

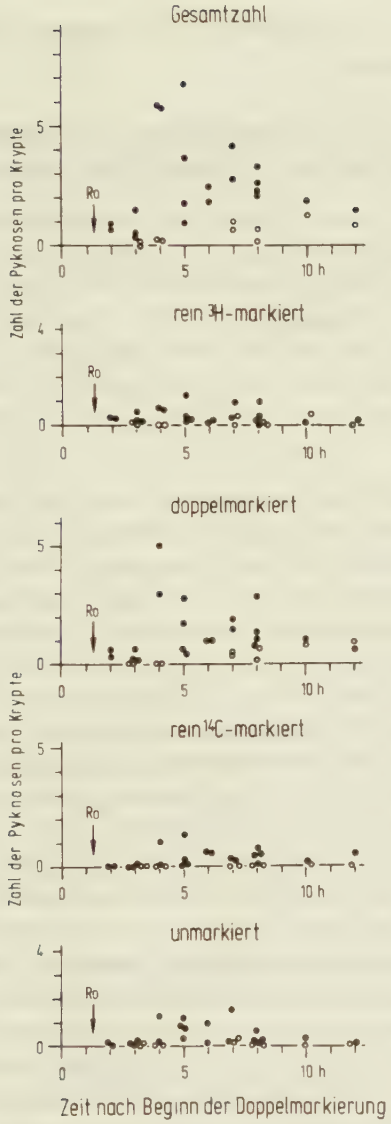


Abb. 7: Zahl der unterschiedlich markierten Pyknosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach der Doppelmarkierung. Kontrolltiere sind durch Kreise, bestrahlte Tiere durch Punkte gekennzeichnet.

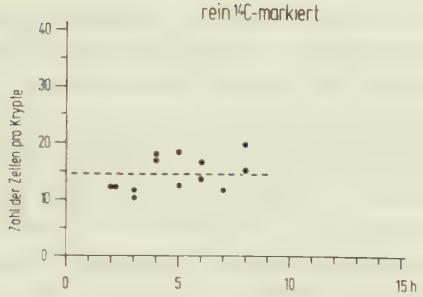
finden sich von der 4. bis zur 8. Stunde erhöhte Pyknosezahlen pro Krypte.

5. Zahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

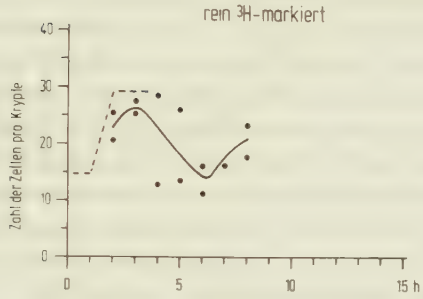
Die Zahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen wurde hier aus folgenden Gründen als Funktion der Zeit nach Doppelmarkierung gemessen: Einmal sollte untersucht werden, ob die hier gemessenen Werte mit den für diese Zellart bekannten zellkinetischen Parametern übereinstimmen. Andererseits sollte geprüft werden, ob es zu einem Zellverlust nach der Bestrahlung kommt, und wie hoch dieser Zellverlust gegebenenfalls ist.

Bei der Doppelmarkierung mit einem Injektionsintervall von einer Stunde entstehen am Anfang der S- und in der G_2-Phase je eine rein ^{14}C- und eine rein ^{3}H-markierte Zellpopulation, deren Zellen kurz nach der Doppelmarkierung eine maximale Altersdifferenz von 1 Stunde aufweisen (vgl. Abb. 3, S. 19). Vor der Mitose und unter steady-state-Bedingungen entspricht die Zahl der rein ^{3}H-markierten Zellen der Zahl der rein ^{14}C-markierten Zellen. Bei einer Generationszeit der Dünndarmkryptenepithelien der Maus von rund 14 Stunden beträgt der Zellfluß 5 % pro Stunde, bezogen auf alle Zellen (SCHULTZE et al., 1972). Daraus folgt, daß eine Zellpopulation von der Breite 1 Stunde aus 5 % der Gesamtzellzahl besteht. Bei einer mittleren Gesamtzellzahl von 318 Zellen pro Krypte müßten rund 16 Zellen pro Krypte rein ^{3}H- oder rein ^{14}C-markiert sein. Die Zellzahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen vor der Mitose konnte nicht ermittelt werden, da zum ersten Beobachtungspunkt ein Teil der Zellen bereits in die Mitose eingetreten war. Aus diesem Grund wurde die Zahl der rein ^{14}C-markierten Interphasezellen vor deren Eintritt in die Mitose gemessen. Vor der Mitose enthalten beide Subpopulationen gleiche Zellzahlen. Abb. 8.1. (S. 37) gibt die gemessenen Zellzahlen der rein

8.1.



8.2.



Zeit nach Beginn der Doppelmarkierung

Abb. 8.1.: Zahl der rein ^{14}C-markierten Interphasezellen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Doppelmarkierung

Jeder Punkt gibt den Mittelwert pro bestrahltem Tier an. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert für alle bestrahlten Tiere in diesem Zeitintervall wieder.

Abb. 8.2.: Zahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Doppelmarkierung

Jeder Punkt gibt den Mittelwert pro Tier nach der Bestrahlung wieder (durchgezogene Kurve). Die gestrichelte Kurve gibt das theoretisch errechnete Verhalten einer rein ^{3}H-markierten Subpopulation wieder (s. Text).

^{14}C-markierten Zellen bis zur 8. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung wieder, bevor eine rein ^{14}C-markierte Mitose aufgetreten ist. Der Mittelwert dieser Zellzahlen liegt bei 15 Zellen pro Krypte und pro Stunde und entspricht damit der Zellflußrate in der Krypte.

Die gestrichelte Kurve in Abb. 8.2. (S. 37) zeigt den theoretischen Verlauf der Zellzahlen der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen kurz vor, während und kurz nach der Mitose. Als mittlere Zahl rein ^{3}H-markierter Zellen pro Krypte wurde, wie im letzten Absatz ausgeführt, die mittlere Zellzahl der rein ^{14}C-markierten Interphasezellen pro Krypte vor der Teilungsphase dieser Subpopulation genommen. Geht jede der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen durch die Mitose, so verdoppelt sich die Zellzahl dieser Population nach der Mitose. Diese Annahme wurde der Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der theoretischen Kurve der Zellzahlen der rein ^{3}H-markierten Population zugrunde gelegt. Die durchgezogene Linie in Abb. 8.2. (S. 37) stellt das gemessene Verhalten der Zellzahlen pro Krypte dar. Es zeigt sich, daß die Zellzahlen der rein ^{3}H-markierten Subpopulation nach der Bestrahlung zu knapp 90 % den entsprechenden Wert der theoretisch ermittelten Kurve erreichen. Das Maximum der Zellzahl der bestrahlten Population liegt bei 3 Stunden nach Versuchsbeginn. Danach schwanken die Werte stark und dürften sich nach einer Zyklusdauer wieder auf einen Wert von 15 rein ^{3}H-markierten Zellen pro Krypte einpendeln.

D. DISKUSSION

I. In-vivo Untersuchung der Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung ionisierender Strahlen mit Hilfe der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

Die Untersuchung einer Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung ionisierender Strahlen läßt sich im Prinzip nur mit Hilfe einer synchronisierten Zellpopulation durchführen. Nur bei einer synchronisierten Zellpopulation kann die Position der Zellen im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung angegeben werden. Unter in-vitro Verhältnissen, d.h. in Zellkulturen, kann eine Synchronisation von Zellen relativ leicht mit unterschiedlichen Methoden erreicht werden. Zu diesen Methoden gehören das Abschütteln von Mitosen, das Abtöten von Zellen, die sich in der S-Phase befinden, etc. (Zusammenstellung der Methoden bei SINCLAIR, 1968).

Im Gegensatz dazu ist unter in-vivo Verhältnissen eine Synchronisation von Zellen nicht möglich. Versuche einer Synchronisation unter in-vivo Bedingungen wurden mit zytotoxischen Substanzen wie z.B. Vincristin und 5-Fluoro-Uracil (5-FU) durchgeführt. Abgesehen davon, daß diese Versuche nicht zum Erfolg geführt haben, wie dies für Vincristin von JELLINGHAUS et al. (1975, 1976) und CAMPLEJOHN et al. (1979) und für 5-FU von CAMPLEJOHN et al. (1977) nachgewiesen wurde, können diese Substanzen gerade wegen ihrer zytotoxischen Wirkung nicht zum Studium der Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung ionisierender Strahlen angewendet werden.

Eine Möglichkeit, in-vivo zumindest S-Phasen-Zellen von den übrigen Interphasezellen zu unterscheiden, bietet eine Pulsmarkierung mit radioaktiv markiertem Thymidin. Die Wirkung ionisierender Strahlen auf die markierten Zellen und auf die Passage dieser Zellen durch den Zellzyklus kann dann mit Hilfe der Autoradiographie untersucht werden.

Diese Methode der Einfachmarkierung mit ^{3}H-Thymidin wendete LESHER (1966a, 1966b, 1967a, 1967b, 1968, 1970, 1974, 1975) an. Er untersuchte die Wirkung einer γ-^{60}Cobalt-Bestrahlung auf den Zellzyklus von Duodenalepithelien der Maus. Dabei fand LESHER (1967b), daß S-Phasezellen bis zu 4.5 Stunden verspätet in die Mitose eintreten, wenn die Mäuse mit 300 R Ganzkörper-bestrahlt wurden.

Bei einer Einfachmarkierung entspricht die markierte Population der Population der S-Phasenzellen. Bei den Dünndarmkryptenepithelien der Maus dauert die S-Phase rund 8 Stunden. Mit einer so breiten markierten Population können Zellzyklusphasen, die im Vergleich zur S-Phase kurz sind, nur ungenau untersucht werden. Dies ist z.B. bei der G_2-Phase der Fall, deren Dauer bei den Dünndarmkryptenzellen der Maus nur 1 Stunde beträgt.

Eine besser geeignete Methode, die Zellzyklusphasenspezifische Wirkung ionisierender Strahlen unter in-vivo Bedingungen zu untersuchen, stellt die Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin dar. Durch die Doppelmarkierung (vgl. Abschn. B.VIII.) werden scharf begrenzte, unterschiedlich markierte Subpopulationen erzeugt, deren Verhalten nach einer Röntgenbestrahlung mit Hilfe der Doppelschichtautoradiographie untersucht werden kann. Da im vorliegenden Fall Subpopulationen geschaffen wurden, deren Zellen kurz nach der Doppelmarkierung untereinander eine Altersdifferenz von maximal 1 Stunde aufweisen (rein ^{14}C-markierte und die rein ^{3}H-markierte Subpopulation), können auch Zyklusphasen genau untersucht werden, deren Dauer im Vergleich zur S-Phasen-Dauer kurz ist (z.B. die G_2-Phase).

Bei den Subpopulationen der rein ^{14}C-, sowie der rein ^{3}H-markierten Zellen kann auf Grund der geringen Altersdifferenz dieser Zellen von "pseudo"-synchronisierten Zellen gesprochen werden.

Mit diesen markierten Subpopulationen kann die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Zellen in definierten Zeitabschnit-

ten des Zellzyklus untersucht werden. Die Positionen der markierten Subpopulationen innerhalb des Zellzyklus sind nach Abschluß der Doppelmarkierung bekannt und können auch zu späteren Zeitpunkten - d.h. zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung oder den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten - auf Grund der bekannten zellkinetischen Parameter ermittelt werden (vgl. Abschn. B.VIII.). Dabei muß jedoch, wie bei anderen Synchronisationsmethoden auch, bedacht werden, daß die pseudosynchronisierten Zellen nach der Doppelmarkierung wieder auseinanderlaufen, d.h. desynchronisieren (SCHULTZE et al., 1979).

Darüber hinaus hat die Doppelmarkierung den Vorteil, daß die Zellflußrate nicht verändert wird. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, wenn die Position der unterschiedlich markierten Subpopulationen innerhalb des Zellzyklus bestimmt werden soll. Im Gegensatz dazu beruht eine Synchronisation mit zytotoxischen Substanzen gerade in einer Veränderung der Zellflußrate. Auch kommt es durch die Verwendung des physiologischen DNA-Vorläufers Thymidin nicht zu einer Schädigung der Zellen wie bei einer Synchronisation mit zytotoxischen Substanzen.

Die Doppelmarkierung mit Hilfe von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin erweist sich somit als eine Methode, die für die in-vivo Untersuchung der Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung ionisierender Strahlen geeignet ist.

II. Strahlendosis

Für die Wahl der in diesen Versuchen verwendeten Strahlendosis bei der Röntgenbestrahlung der Tiere waren folgende Gründe maßgebend:

(1) Die Strahlendosis sollte im Bereich der therapeutisch benutzten Einzeldosis bei der fraktionierten Bestrahlung liegen (150 - 300 rd).

(2) Die Strahlendosis sollte deutlich unter der LD_{50} für Labormäuse liegen (~700 R), da sonst andere Strahleneffekte im Vordergrund stehen würden, die die Untersuchung der Mitoseverzögerung nach einer Röntgenbestrahlung erschweren könnten.

(3) Die Strahlendosis mußte jedoch auch hoch genug gewählt werden, damit der Strahleneffekt "Mitoseverzögerung" auch hinreichend sichtbar wird.

(4) In den bisher in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen sind unterschiedliche Strahlendosen verwendet worden. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Dosis sollte mit anderen in der Literatur bei ähnlichen Versuchen angegebenen Strahlendosen in etwa vergleichbar sein.

Aus diesen Gründen wurde eine Dosis von 220 R ≙ 200 rd gewählt, die den genannten Erfordernissen in etwa entsprach.

III. Verwendung der Gesamtzellzahl pro Krypte als Bezugsgröße für die Zahl der Mitosen und Pyknosen nach der Bestrahlung

Eine Veränderung einzelner zellkinetischer Parameter kann nur dann sinnvoll erfaßt werden, wenn diese auf eine konstante Größe bezogen werden.

LESHER (1966b, 1967b) verwendete zur Untersuchung der Mitoseverzögerung und der Veränderung der Generationszeit nach Bestrahlung die von QUASTLER und SHERMAN (1959) eingeführte Methode der Prozent-markierte-Mitose-Kurve (PLM-Kurve). Dabei wird die Anzahl der markierten Mitosen auf die Gesamtzahl aller Mitosen in der Krypte bezogen. Dieses Verfahren ist aber nur dann erlaubt, wenn die Gesamtmitosezahl pro Krypte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konstant bleibt. Unter normalen Bedingungen ist dies auch bei den Dünndarmkryptenepithelzellen der Maus der Fall.

Nach einer Röntgenbestrahlung ändert sich jedoch eine Reihe zellkinetischer Parameter, darunter auch die Gesamtzahl der Mitosen. Abb. 5 (S. 33) zeigt, daß die Gesamtmitosezahl in der Krypte im Anschluß an die Röntgenbestrahlung (200 rd) auf 0 Mitosen pro Krypte abfällt. Dieser Effekt ist auch von anderen Autoren gefunden worden (z.B. DOIDA et al., 1969; LESHER et al., 1970; DEVIK, 1971) und ist von der applizierten Strahlendosis abhängig. Durch den Abfall der Gesamtzahl der Mitosen in der Krypte verliert dieser Parameter seinen Wert als konstante Bezugsgröße. Die Anwendung der PLM-Kurve zur Untersuchung von zellkinetischen Veränderungen nach Bestrahlung ist daher nicht zulässig.

Im Gegensatz zur Gesamtzahl der Mitosen bleibt die Gesamtzellzahl in der Krypte auch nach der Bestrahlung konstant, wie Abb. 6 (S. 33) zeigt. DEVIK (1971) findet bei einer Strahlendosis bis zu 200 R innerhalb des ersten Tages nach der Bestrahlung ebenfalls keine Veränderung der Gesamtzellzahl in der Krypte.

Als konstante Bezugsgröße nach einer Röntgenbestrahlung kann somit die Gesamtzellzahl der Krypte benutzt werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Untersuchung Mitosen und Pyknosen pro Krypte ausgewertet.

IV. Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, gemessen an der Mitoseverzögerung

Die Röntgenbestrahlung eines Zellverbandes trifft die einzelnen Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Diese entsprechen unterschiedlichen funktionellen und biochemischen Zuständen der Zelle. Die Schädigung DNA-synthetisierender Enzyme mag andere Folgen haben und zu einem anderen Zeitpunkt auftreten als eine Schädigung der Synthese der Spindelproteine. Die Reaktion der Zelle auf die Röntgen-

bestrahlung ist eng mit ihrem jeweiligen Funktionszustand verknüpft (TOLMACH et al., 1971). Dies dürfte einer der wesentlichen Gründe für die unterschiedliche Phasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen sein.

1. Zellen in der G_2-Phase (rein ^{3}H-markierte Zellen)

Die Zellen der rein ^{3}H-markierten Population befinden sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung zu rund zwei Drittel der Population in der G_2-Phase, der andere Teil der Population ist schon in die Mitose eingetreten.

Es soll zunächst geklärt werden, wie sich die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung einmal in der G_2-Phase, dann aber auch in der Mitose befinden, unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen verhalten. Die rein ^{3}H-markierten Zellen, die schon vor der Bestrahlung in die Mitose eingetreten sind, sollten sich zunächst genauso verhalten wie die rein ^{3}H-markierten Zellen der Kontrolltiere, d.h. die Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Tiere der Bestrahlungsgruppe sollte vor der Bestrahlung der Kurve der Kontrolltiere entsprechen. Wie die Kurve in Abb. 4.1. (S. 27) zeigt, sind zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung (in Abb. 4 mit "Rö" gekennzeichnet) bei den Kontrolltieren im Mittel 4 rein ^{3}H-markierte Mitosen pro Krypte zu erwarten. 40 Minuten nach der Bestrahlung, dem ersten Beobachtungszeitpunkt dieser Untersuchung, wird bei den bestrahlten Tieren keine einzige rein ^{3}H-markierte Mitose gefunden. Im Gegensatz dazu zeigt die Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere ein Maximum mit rund 6 Mitosen pro Krypte. Daraus folgt, daß diejenigen Zellen der rein ^{3}H-markierten Population, die sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung schon in der Mitose befanden, die Mitose entweder beendet haben oder, da sie nicht mehr beobachtet werden, die Population verlassen haben oder abgestorben sind. Jedenfalls werden diese Mitosen nicht blockiert. Wäre dies der Fall, so müßte die Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen der bestrahlten Tiere zum er-

sten Beobachtungszeitpunkt, 2 Stunden nach Beginn der Doppelmarkierung oder 40 Minuten nach der Bestrahlung, größer als 0 Mitosen pro Krypte sein. Zu diesem Zeitpunkt wurde aber keine rein ^{3}H-markierte Mitose nach der Bestrahlung gefunden. In Übereinstimmung damit berichten TERASIMA und TOLMACH (1963), daß HeLa-Zellen, die in der Mitose bestrahlt wurden, diese Mitose durchlaufen und erst in der darauffolgenden Mitose verzögert wurden. Auch LESHER und LESHER (1974) zeigen, daß in-vivo in der Mitose bestrahlte Zellen die Teilungsphase ungehindert durchlaufen.

Die Zellen, die sich bei der vorliegenden Untersuchung zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung schon in der Mitose befanden, dürften also mehr oder weniger ungehindert die Mitose durchlaufen. Die Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen der bestrahlten Tiere dürfte nach der Bestrahlung dann so verlaufen, wie es durch die feingestrichelte Linie in Abb. 4.1. (S. 27) dargestellt ist. Rein ^{3}H-markierte Mitosen, die nach dem ersten Beobachtungspunkt gemessen werden (durchgezogene Kurve und Punkte), stammen somit von den rein ^{3}H-markierten Zellen ab, die sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung in der G_2-Phase befunden haben.

1.1. Mitoseverzögerung (Abb. 4.1., S. 27)

Ein Vergleich der Mitosekurven der bestrahlten Tiere und der Kontrolltiere (Abb. 4.1.) läßt ein deutlich verspätetes Auftreten von rein ^{3}H-markierten Mitosen nach der Bestrahlung erkennen. Diese Tatsache wird als "Mitoseverzögerung" bezeichnet und dient in strahlenbiologischen Untersuchungen als ein Maß für die Strahlenschädigung proliferierender Zellen. Dabei wird das Ausmaß der Verzögerung in Minuten pro R oder rd angegeben.

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit (C.II.1.1.) ausführlich dargelegt wurde, kompliziert sich die Berechnung der mittleren Mitoseverzögerung für die in der G_2-Phase bestrahlten, rein ^{3}H-markierten Zellen dadurch, daß die Werte der einzel-

nen Tiere im Vergleich zu ihrem Mittelwert stark streuen, und daß die Kurve zu späteren Zeiten hin einen langen Ausläufer aufweist. Die in dem Ergebnisteil durchgeführte Berechnung der mittleren Mitoseverzögerung für diese Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt worden waren, ergab einen unteren Grenzwert von 0.8 und einen oberen von 1.2 Minuten pro rd.

Bei entsprechenden in-vivo Versuchen am Duodenalepithel der Maus kann bei LESHER (1967b) eine Mitoseverzögerung von 4.5 - 8 Stunden entnommen werden (0.8 - 1.5 Minuten pro rd). Dieser Schluß kann aus der Interpretation der 0-Stunden-Gruppe der in der Arbeit von LESHER angegebenen Prozent-markierter-Mitosen-Kurve (PLM-Kurve) gezogen werden. Bis die PLM-Kurve der markierten Population (bei der angewendeten Einfachmarkierung: der Population der S-Phasezellen) den 100 %-Wert erreicht, treten noch unmarkierte Mitosen auf, die bei der Versuchsanordnung LESHERs zu diesem Zeitpunkt nur von Zellen abstammen können, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden. Die unmarkierten Zellen der G_1-Phase können die Mitose noch nicht erreicht haben. Der 100 %-Wert wird erst nach rund 8 Stunden erreicht. Bis zu diesem Zeitpunkt treten somit unmarkierte Mitosen auf, die von in der G_2-Phase bestrahlten Zellen stammen. Der aus der Arbeit von LESHER (1967b) errechnete Wert für eine mittlere Mitoseverzögerung von Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden, stimmt relativ gut mit dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen Wert überein. Dabei muß auch berücksichtigt werden, daß die Tiere in den Versuchen von LESHER eine höhere Strahlendosis von 300 R erhielten.

1.2. Mitoseverlust

Der weitere Vergleich der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der bestrahlten Tiere mit der entsprechenden Kurve der Kontrolltiere zeigt, daß die Fläche unter der Kurve der bestrahlten Tiere deutlich kleiner ist. Die Fläche unter der

Mitosekurve der rein ^{3}H-markierten Subpopulation ist ein relatives Maß für die Größe dieser Subpopulation.

Die in Abb. 4.1. (S. 27) eingezeichnete, grobgestrichelte Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere ist bis zur 3. Stunde der Arbeit von BURHOLT und Mitarbeitern entnommen. Diese Autoren haben nach Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin den Durchgang der 1 Stunde breiten, rein ^{3}H-markierten Zellpopulation durch die folgende Mitose gemessen. Die Fläche unter dieser Kurve des Prozentsatzes der rein ^{3}H-markierten Mitosen betrug, wie zu erwarten war, 1 Stunde. Für die vorliegende Untersuchung wurden die Prozentsätze dieser Kurve in Zahl der rein ^{3}H-markierten Mitosen pro Krypte umgerechnet. Dieser Zahl entsprechen die in Abb. 4.1. (S. 27) bis zur 3. Stunde eingezeichneten Kreise. Bei 3 Stunden dekken sich die in dieser Untersuchung gemessenen Werte der Kontrolltiere mit denen aus der oben zitierten Arbeit entnommenen. Das bedeutet, daß die Fläche unter der grobgestrichelten Kurve der Kontrolltiere der Fläche einer 1 Stunde breiten Population entspricht.

Die Fläche unter der Mitosekurve der bestrahlten Tiere läßt sich wegen des unsicheren Verlaufs der Mitosekurve nach der 6. Stunde nur ungenau bestimmen. Diese Fläche ist jedoch offensichtlich kleiner als die Fläche unter der Kurve der Kontrolltiere. Von dieser Fläche muß jedoch noch die Fläche unter der in Abb. 4.1. feingestrichelten Kurve abgezogen werden. Dieser Teil der Fläche entspricht nämlich dem Anteil der rein ^{3}H-markierten Population, der zum Zeitpunkt der Bestrahlung schon in der Mitose war und bei der vorliegenden Versuchsanordnung nicht mehr erfaßt werden konnte (vgl. Abschn. D.IV.1., S. 44 f). Dieser Anteil beträgt aber rund ein Drittel der Gesamtpopulation der rein ^{3}H-markierten Zellen. Wird unter diesem Gesichtspunkt die Fläche unter der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen der Kontrolltiere und der bestrahlten Tiere erneut verglichen, so läßt sich abschätzen, daß die Fläche unter der Kurve der Kontrolltiere

nur wenig größer ist als die Fläche unter der Kurve der bestrahlten Tiere. Bei diesem Vergleich muß jedoch nochmals auf die Ungenauigkeit der Bestimmung der Fläche unter der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen nach Bestrahlung hingewiesen werden. Darüber hinaus geht dieser Vergleich von einer gleich langen Mitosedauer vor und nach Bestrahlung aus.

Da ein Verlust an Fläche unter der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen einem Verlust an Zellen entspricht, dürfte das Ausmaß eines solchen Zellverlustes bei der rein ^{3}H-markierten Population nach der Bestrahlung nur gering sein.

1.3. Verhalten der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen nach der Bestrahlung

Auch das Verhalten der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen nach der Bestrahlung kann Aufschluß über einen eventuell vorhandenen Zellverlust dieser Subpopulation geben. Dadurch können die Schlüsse, die aus der Interpretation der Mitosekurve gezogen wurden (vgl. Abschn. D.IV.1.2.), überprüft werden. Aus diesem Grund wurde versucht, die Zellzahlen dieser bestrahlten, rein ^{3}H-markierten Subpopulation kurz vor, während und nach der Mitose zu bestimmen. Im Ergebnisteil (vgl. Abschn. C.II.5., S. 36) wurde diese Bestimmung durchgeführt, Abb. 8.2. (S. 37) stellt die Verhältnisse graphisch dar.

Die gestrichelte Kurve gibt das theoretisch errechnete Verhalten der Zellzahlen der rein ^{3}H-markierten Subpopulation wieder, wenn vorausgesetzt wird, daß jede einzelne rein ^{3}H-markierte Zelle durch die Mitose geht, wenn also kein Zellverlust vor der Mitose auftritt. Die durchgezogene Kurve gibt das tatsächlich gemessene Verhalten wieder. Der Vergleich beider Kurven zeigt, daß die gemessenen Werte rund 90 % der theoretisch errechneten Werte erreichen, d.h. daß rund 90 % der rein ^{3}H-markierten Zellen nach der Bestrahlung die Mitose durchlaufen. Ein größerer Zellverlust dieser rein

^{3}H-markierten Subpopulation nach der Bestrahlung kann somit ausgeschlossen werden.

Dies stimmt gut mit der Schlußfolgerung überein, die aus dem Vergleich der Flächen unter der Kurve der rein ^{3}H-markierten Mitosen mit und ohne Bestrahlung gezogen wurde.

Die relativ gute Übereinstimmung des gemessenen Anstiegs der Zahl der rein ^{3}H-markierten Interphasezellen mit dem theoretisch zu erwartenden Wert gibt Anhaltspunkte dafür, daß die Dauer der ersten Mitose nach der Bestrahlung selbst nicht verlängert ist. Auch DENEKAMP (1975) findet keine wesentliche Verlängerung der Mitosedauer nach der Bestrahlung.

Zusammenfassend läßt sich über die hier untersuchte Strahlenempfindlichkeit von Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden, folgendes aussagen:

G_2-Zellen weisen nach einer Bestrahlung von 200 rd eine deutliche, für die einzelnen Zellen stark schwankende mittlere Mitoseverzögerung zwischen 0.8 und 1.2 Minuten pro rd auf. Ein größerer Zellverlust dieser rein ^{3}H-markierten Zellpopulation ist nach der Bestrahlung nicht nachzuweisen. Die Dauer der Mitose selbst dürfte durch die Bestrahlung nicht wesentlich verlängert werden.

2. Zellen in der S-Phase (doppelmarkierte Zellen, Abb. 4.2., S. 27)

Die doppelmarkierten Zellen liegen zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung zum größten Teil in der S-Phase. Nur 5 % der doppelmarkierten Subpopulation sind zu diesem Zeitpunkt schon in die G_2-Phase übergetreten.

Wird der Durchgang dieser doppelmarkierten Zellen durch die Mitose bei bestrahlten und unbestrahlten Tieren verglichen, so zeigt sich, ähnlich wie bei den rein ^{3}H-markierten Zellen, ein verspätetes Auftreten der doppelmarkierten Mitosen nach der Bestrahlung. Die im Ergebnisteil (C.II.1.2., S. 26 ff) durchgeführte Berechnung der mittleren Mitosever-

zögerung für diese Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden, ergab einen Wert von 0.5 - 0.6 Minuten pro rd.

In der Zusammenstellung von in-vitro Untersuchungen bei SINCLAIR (1968) finden sich Werte von 0.2 - 2.3 Minuten pro rd, wobei Strahlendosen von 200 - 1000 rd angewendet wurden. SINCLAIR (1967) findet nach einer Röntgenbestrahlung mit 235 rd eine Mitoseverzögerung von 0.3 - 0.4, BOOTSMA (1965) bei einer Dosis von 200 rd eine solche von 1.2 - 1.5 Minuten pro rd. LEEPER (1972) gibt eine Mitoseverzögerung von 0.3 - 0.8 Minuten pro rd nach einer Bestrahlung mit 150, 300 und 600 rd an.

Schon diese kleine Auswahl aus einer Vielzahl von Untersuchungen zeigt die große Schwankungsbreite der Ergebnisse. Der in dieser Untersuchung gewonnene Wert liegt dabei im unteren bis mittleren Bereich der Werte für eine mittlere Mitoseverzögerung von Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden.

Bei in-vivo Untersuchungen am Duodenalepithel der Maus verwendet LESHER eine Bestrahlungsdosis von 300 R γ-^{60}Co und findet eine Mitoseverzögerung von umgerechnet 0.9 - 1.0 Minuten pro rd (LESHER, 1966b, 1967b; LESHER et al., 1968). Bei späteren Untersuchungen mit Strahlendosen von 150 - 1000 rd fanden LESHER und Mitarbeiter (1970, 1974, 1975) eine Mitoseverzögerung von umgerechnet 0.65 Minuten pro rd. Es soll darauf hingewiesen werden, daß sowohl bei LESHER als auch in der vorliegenden Arbeit die Mitoseverzögerung an den Dünndarmkryptenepithelien der Maus untersucht wurde, daß ansonsten jedoch unterschiedliche Untersuchungsmethoden benutzt wurden (vgl. Abschn. D.IV.5.2.). Trotzdem liegt der von LESHER und Mitarbeiter ermittelte Wert im Bereich des in der hier vorliegenden Arbeit gemessenen Wertes.

Der Vergleich der Flächen unter der Kurve doppelmarkierter Mitosen von bestrahlten Tieren und Kontrolltieren zeigt, daß die Fläche unter der Kurve der bestrahlten Tiere bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes rund 15 % kleiner ist als die

Fläche der Kontrolltiere. Da die Kurve der bestrahlten Tiere über den Beobachtungszeitraum hinausgeht, wird ein Teil der Fläche eventuell nicht mehr gemessen. Daraus folgt, daß es zu keinem größeren Verlust an Fläche und damit gleichbedeutend zu keinem größeren Zellverlust der in der S-Phase bestrahlten Zellen gekommen ist. Auch bei diesem Flächenvergleich gilt die Annahme, daß sich die Mitosedauer nach der Bestrahlung nicht verändert hat. Anhaltspunkte für eine gleichlange Mitosedauer auch nach der Bestrahlung wurden bereits für die Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden, diskutiert (vgl. D.IV.1.3.).

Ein weiterer Hinweis, daß der Zellverlust nur gering sein kann, wenn er überhaupt vorhanden ist, ergibt sich aus der praktisch unveränderten Gesamtzellzahl in der Krypte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg (vgl. Abb. 6, S. 33). Ein erheblicher Zellverlust der doppelmarkierten Zellen, die rund 50 % der gesamten Kryptenzellen ausmachen, müßte in einer Verringerung der Gesamtzellzahl pro Krypte sichtbar sein.

Zusammenfassend läßt sich über die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befanden, folgendes aussagen:

Diese Zellen weisen gegenüber den in der G_2-Phase bestrahlten Zellen eine geringere mittlere Mitoseverzögerung auf, die etwa 0.5 - 0.6 Minuten pro rd beträgt. Ein Zellverlust größeren Ausmaßes infolge der Bestrahlung kann auch bei der doppelmarkierten Subpopulation nicht festgestellt werden.

3. Zellen in der frühen S-Phase (rein ^{14}C-markierte Zellen, Abb. 4.3., S. 27)

Die rein ^{14}C-markierten Zellen befinden sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S-Phase. Wie Abb. 4.3. zeigt, wurde nur der Anfang der Kurve rein ^{14}C-markierter Mitosen der bestrahlten Tiere bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes gemessen. Daher ist eine quantitative Betrachtung des Verhaltens

der rein ^{14}C-markierten Zellen nach der Bestrahlung nicht möglich. Aus den Messungen läßt sich lediglich entnehmen, daß die Zahl der rein ^{14}C-markierten Mitosen nach der Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrolltieren später und flacher ansteigt. Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß das Maximum der Kurve der Kontrolltiere etwas früher auftritt, als es nach Untersuchungen von SCHULTZE und Mitarbeitern (1979) an unbestrahlten Tieren zu erwarten ist.

Der flache Anstieg der Kurve der rein ^{14}C-markierten Mitosen nach Bestrahlung deutet auf eine geringe Mitoseverzögerung hin, ohne daß ein exakter Wert aus den oben angeführten Gründen angegeben werden könnte.

4. Zellen in der G_1-Phase (unmarkierte Zellen, Abb. 4.4., S. 27)

Die unmarkierten Zellen liegen zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung in der G_1-, zu einem geringen Teil (ca. 7.5 %) auch in der frühen S-Phase. Wie Abb. 4.4. zeigt, kann nichts Genaues über eine Mitoseverzögerung der Zellen, die in der G_1-Phase bestrahlt wurden, ausgesagt werden. Sowohl für die unbestrahlten wie auch für die bestrahlten Zellen wird nur der Anfang der Kurve unmarkierter Mitosen innerhalb des gewählten Beobachtungsintervalls gemessen.

Die Zahl der bestrahlten, wie auch der unbestrahlten Tiere steigt zum selben Zeitpunkt an. Allerdings ist der Anstieg bei den Kontrolltieren etwas steiler. Daraus läßt sich zumindest schließen, daß die Mitoseverzögerung der G_1-Phasezellen nach der Bestrahlung gering ist. Aus dem Abfall des Markierungsindexes nach einer Bestrahlung schließt LESHER (1974) auf einen Block der Zellen am Übergang von der G_1- zur S-Phase. Das hier gemessene langsamere Eintreten der unmarkierten Zellen in die Mitose muß jedoch nicht unbedingt mit einem solchen Block in Zusammenhang stehen, sondern kann auch durch ein langsameres Durchlaufen der unmarkierten Zellen durch die S- und die G_2-Phase bedingt sein.

5. Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Literatur

5.1. In-vitro Untersuchungen

In einem Übersichtsartikel hat SINCLAIR (1968) eine große Anzahl von Untersuchungen über die Phasen-spezifische Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierenden Strahlen zusammengefaßt. Ein Vergleich der einzelnen Ergebnisse ist kaum möglich, weil die verschiedenen Autoren unterschiedliche Strahlenarten, -dosen, Untersuchungsmethoden und Zellarten verwendet haben. Trotzdem versuchte SINCLAIR ein allgemeines Schema der Strahlensensibilität einzelner Zellzyklusphasen, gemessen anhand der Mitoseverzögerung, abzuleiten. Für in-vitro kultivierte Zellen mit einer langen G_1-Phase stellte er Empfindlichkeitsmaxima in der S-Phase und in der Mitose fest, während die G_1- und die G_2-Phase Empfindlichkeitsminima aufwiesen. Zellen mit einer kurzen G_1-Phase zeigten kein Empfindlichkeitsminimum in dieser Zellzyklusphase. Die Ursache der Mitoseverzögerung sah SINCLAIR in einer Verlängerung der S-Phase infolge einer reduzierten DNA-Syntheserate und in einem Block der Zellen in der G_2-Phase.

SINCLAIR gibt für die Mitoseverzögerung Werte von 0.4 - 2.6 Minuten pro rd an, wenn die Zellen mit Dosen bis zu 1000 rd in der G_2-Phase bestrahlt wurden. Erfolgte die Bestrahlung in der S-Phase, so wies die Mitoseverzögerung einen Wert zwischen 0.2 und 2.3 Minuten pro rd auf (vgl. Tab. 2, S. 58). Unter den in der Tabelle aufgeführten Arbeiten ist die von BOOTSMA (1964) besonders interessant. Dieser Autor fand bei menschlichen Nierenzellen eine Mitoseverzögerung von 1.5 Minuten pro rd, wenn er die Zellen mit 200 R in der G_2-Phase bestrahlte. Die S-Phasezellen wiesen einen ähnlichen Wert auf, während bei den G_1-Zellen nur eine geringe Mitoseverzögerung gemessen wurde. Bei seiner Untersuchung benutzte BOOTSMA eine Art von Doppelmarkierung, indem er zuerst ^{14}C-Thymidin injizierte, 20 Minuten später bestrahlte und danach ^{3}H-Thymidin applizierte. Bei dieser Methode der Doppelmarkie-

rung muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Aufnahme und der Einbau des zuletzt angebotenen ^{3}H-Thymidins nach der Bestrahlung schon verändert sein kann (OKADA, 1970).

TOLMACH und Mitarbeiter (1971) stellten bei HeLa-Zellen einen anderen Verlauf der Strahlenempfindlichkeit im Zellzyklus hinsichtlich der Mitoseverzögerung fest. Nach einem Minimum in der G_1-Phase steigt die Empfindlichkeit bis zur Mitose hin kontinuierlich an. Bei einer Bestrahlung mit 300 und 500 R registrierten die Autoren eine Mitoseverzögerung von 1.4 Minuten pro rd für die in der G_2-Phase bestrahlten Zellen und 0.7 - 1.2 Minuten pro rd für solche Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden.

Auch TOLMACH und Mitarbeiter vermuten, daß die Mitoseverzögerung aus zwei Komponenten besteht, einer Verzögerung infolge einer reduzierten DNA-Syntheserate und einem Block der Zellen in der G_2-Phase. Letztere Komponente halten sie für den zeitlich bedeutendsten Effekt. Sie nehmen an, daß die Synthese solcher Proteine vermindert ist, die für den Ablauf der Mitose wichtig sind, oder daß die Kondensation des Chromatins, das die Mitose einleitet, verhindert wird. Als weiteren Grund für die Mitoseverzögerung nennen TOLMACH und Mitarbeiter zeitaufwendige Reparaturvorgänge der DNA.

Wenn diese Ergebnisse miteinander verglichen werden, so zeigt sich, daß die Werte für die Mitoseverzögerung nach einer Bestrahlung für ein und dieselbe Zellzyklusphase je nach Untersucher stark differieren (vgl. Tab. 2, S. 58). Wie schon erwähnt, dürfte dies zum Teil auf unterschiedlichen Versuchsbedingungen und auf den verschiedenen Zellarten, die untersucht wurden, beruhen. Auch kann nicht erwartet werden, daß die Beziehung zwischen der Bestrahlungsdosis und der Dauer der Mitoseverzögerung bis in hohe Dosisbereiche hinein linear bleibt. Aus diesen Gründen kommt es dann mehr auf den qualitativen Unterschied der Strahlensensibilität der Zellen innerhalb des Zellzyklus an als auf absolute Zahlenwerte. Einig sind sich alle Autoren, daß die G_1-

Phase am wenigsten strahlensensibel ist. Im Verlauf der S-Phase steigt die Strahlenempfindlichkeit an. Während FROESE (1966), SINCLAIR (1968) und LAFONTAINE (1972) die größte Strahlensensibilität, gemessen anhand der Mitoseverzögerung, in der späten S-Phase lokalisieren, finden andere Autoren (DEWEY et al., 1962, 1966; TERASIMA et al., 1963; BOOTSMA, 1964; TOLMACH et al., 1971), daß die Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt wurden, die größte Mitoseverzögerung aufweisen.

5.2. In-vivo Untersuchungen

Die Übertragbarkeit von unter in-vitro Bedingungen gewonnenen Ergebnissen auf in-vivo Verhältnisse ist kaum zulässig, da der Gesamtorganismus über andere Reaktions- und Kompensationsmechanismen verfügt als die isoliert wachsenden Zellen der Zellkultur.

In-vivo Untersuchungen über den Einfluß von Strahlen auf das Intestinalepithel der Maus wurden hauptsächlich von LESHER und Mitarbeitern durchgeführt. Diejenigen Untersuchungen, die mit der hier vorliegenden Untersuchung verglichen werden können, beziehen sich auf das Duodenalepithel der Maus nach einer einmaligen Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen γ-^{60}Cobalt. Dabei unterscheidet sich die Untersuchungsmethode von LESHER von der hier angewendeten erheblich.

LESHER benutzt im Gegensatz zu der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin eine Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin. ^{3}H-Thymidin wurde dabei von LESHER unmittelbar vor und zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung appliziert, um das Verhalten von markierten Mitosen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung zu untersuchen. Durch die Dauer des Zeitintervalls zwischen der Markierung und der Bestrahlung kann LESHER schließen, in welcher Zellzyklusphase sich die markierten Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. Eine ^{3}H-Thymidingabe unmit-

telbar vor der Bestrahlung führt bei dieser Methodik zu einer Markierung der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befinden (bei LESHER als "0-Stunden-Gruppe" bezeichnet). Wird das ^{3}H-Thymidin 6 Stunden nach der Bestrahlung appliziert, so werden nach LESHER die Zellen markiert, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S- und der späten G_1-Phase befinden ("6-Stunden-Gruppe"). In der "12-Stunden-Gruppe" sind nach LESHER (1966b, 1967b) die Zellen markiert, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen G_1-Phase und der Mitose befanden.

Gegen diese Methodik der Markierung nach der Bestrahlung gibt es Einwände. Die Position der Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung läßt sich nur dann feststellen, wenn die Zellflußrate durch die Bestrahlung nicht verändert wurde. Bei der "6-Stunden-Gruppe" nimmt LESHER an, daß die Zellen, die nun in der S-Phase markiert werden, 6 Stunden vorher zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S- und der späten G_1-Phase waren. Nach MAK und TILL (1963), ELKIND und WHITMORE (1967) und auch LESHER (1970) kommt es nach Bestrahlung zu einem Block der Zellen am Übergang von der G_1- zur S-Phase. Das bedeutet aber, daß die Zellflußrate sich ändert. Deswegen kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich verschieden lange blockierte Zellen überholen. Damit träte aber eine gänzlich anders zusammengesetzte Population an Zellen nach der Bestrahlung zur Markierung in die S-Phase ein, als LESHER es annimmt.

Auch aus einem weiteren Grund ist die Markierung nach der Bestrahlung problematisch. OKADA (1970) findet eine verminderte DNA-Syntheserate nach Bestrahlung, so daß die Aufnahme des angebotenen radioaktiv markierten ^{3}H-Thymidins vermindert sein kann. LESHER selbst (1967b) findet eine deutlich verminderte mittlere Kornzahl pro Kern von nur 30 % des Normalwertes. Durch die geringe Kornzahl pro Kern besteht die Möglichkeit der Fehlinterpretation der Ergebnisse.

Für den Nachweis der Mitoseverzögerung benutzt LESHER (1966b, 1967b) die Methode der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve (PLM-Kurve). Aus der Verschiebung des ansteigenden Schenkels der PLM-Kurve bei den bestrahlten Tieren zu späteren Zeiten hin, entnimmt LESHER die Dauer des G_2-Blocks, der einer Mitoseverzögerung entspricht.

Dagegen läßt sich jedoch einwenden, daß die Methode der PLM-Kurve nur dann angewendet werden sollte, wenn die Gesamtzahl der Mitosen in der Krypte konstant bleibt. Wie in Abschnitt D.III. (S. 42 f) ausführlich erörtert wurde, ist dies jedoch nach der Bestrahlung nicht der Fall. In späteren Arbeiten geben LESHER und Mitarbeiter (1970, 1974, 1975) dann auch die Zahl der Mitosen pro Krypte an, beziehen also auf die Gesamtzahl in der Krypte, die auch nach der Bestrahlung konstant bleibt (vgl. Abb. 6, S. 33).

Aus den Arbeiten LESHERs lassen sich folgende Werte der Mitoseverzögerung ermitteln: Indirekte Hinweise für eine Mitoseverzögerung für Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt werden, finden sich bei LESHER (1967b). Es läßt sich aus den dort aufgeführten Kurven eine Mitoseverzögerung von 0.8 - 1.5 Minuten pro rd berechnen (vgl. Abschnitt D.IV.1.1.). Bei einer Bestrahlung mit 300 R γ-^{60}Cobalt ermittelt LESHER (1967b) einen G_2-Block (Mitoseverzögerung) für Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden, von umgerechnet 0.9 - 1.0 Minuten pro rd. In späteren Arbeiten finden LESHER und Mitarbeiter (1970, 1974, 1975) eine Mitoseverzögerung von umgerechnet 0.65 Minuten pro rd, wenn die Zellen mit Strahlendosen von 150 - 1000 R in der S-Phase bestrahlt wurden. Für Zellen, die in der G_1- und der frühen S-Phase bestrahlt wurden, gibt LESHER (1966b, 1967b) einen Wert von 0.3 - 0.6 Minuten pro rd an.

Bei LESHER (1966b, 1967b) und bei LESHER und Mitarbeitern (1970, 1974, 1975) ist die Mitoseverzögerung am geringsten für die Zellen, die in der G_1- und der frühen S-Phase bestrahlt wurden. Die Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt

Mitoseverzögerung in Minuten pro rd

	G_1-Phase	S-Phase	G_2-Phase	Mitose	Autor
			1.5		BOOTSMA, 1964
in-vitro Untersuchungen	0.1 - 1.0	0.2 - 2.3	0.4 - 2.6	0.5 - 0.9	Zusammenstellung von SINCLAIR, 1968
		0.7 - 1.2	1.4		TOLMACH et al., 1971
	0.29	0.3 - 0.8	0.78	0.43	LEEPER et al., 1972
in-vivo	0.3 - 0.6	0.6 - 1.0[a]	0.8 - 1.5		LESHER, 1967b, LESHER et al., 1970, 1974
Untersuchungen		0.5 - 0.6	0.8 - 1.2		eigene Untersuchungen

Tabelle 2: Zusammenstellung der gemessenen Mitoseverzögerung nach Bestrahlung von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

[a] = Bei der Berechnung wurde der Wert des G_2-Blocks mitverwendet.

wurden, weisen die größte Mitoseverzögerung auf.

Die in der vorliegenden Untersuchung gemessenen Werte für eine Mitoseverzögerung von Zellen, die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestrahlt wurden, liegen nur geringfügig unter den Werten, die von LESHER und LESHER und Mitarbeitern gemessen wurden (vgl. Tab. 2, S. 58). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Mitoseverzögerung für die G_2-Zellen direkt gemessen, da bei der Doppelmarkierung mit ^3H- und ^{14}C-Thymidin eine markierte Subpopulation entsteht, die nur G_2-Zellen enthält (rein ^3H-markierte Subpopulation).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Zellen, die in der G_2-Phase bestrahlt werden, gegenüber Zellen, die in den anderen Phasen des Zellzyklus unter in-vivo Bedingungen bestrahlt werden, am strahlensensibelsten reagieren, wenn als Kriterium der Strahlenempfindlichkeit die Mitoseverzögerung gewählt wird.

V. Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, gemessen am Auftreten von Pyknosen

1. Probleme bei der Beurteilung der Pyknosewerte

Wie schon in Abschn. B.VII.5. (S. 16) erwähnt wurde, ist die Auswertung der pyknotischen Zellkerne in den Kryptenquetschpräparaten mit einer besonderen Schwierigkeit belastet. Aus diesem Grunde wurde im vorliegenden Fall zur mikroskopischen Beurteilung einer Pyknose folgende Definition benutzt: Als Pyknose wurden runde, strukturlose, homogen hyperchrome Körper von mindestens 4 - 5 μ Durchmesser gewertet. Da es beim Quetschen der Krypten sehr leicht zu einem weiten Auseinandersprengen einzelner pyknotischer Kernfragmente kommen kann, konnte bei einigen Tieren die quantitative Erfassung der Zahl der Pyknosen nicht vorgenommen werden (Kontrolltiere in der 10. und 12. Stunde, bestrahlte Tiere in

dem gleichen Zeitraum).

Nach DEVIK (1971) und GEDIGK und Mitarbeiter (1974) ist die Pyknose nicht die einzige Form des lichtmikroskopisch sichtbaren Zelluntergangs. Eine weitere Form ist die Karyorhexis. Dabei kommt es zu einer Auflösung des Zellkerns, die bei der hier verwendeten Quetschtechnik nicht nachweisbar ist. Inwieweit es in den vorliegenden Versuchen, vor allem nach einer Bestrahlung, zu einer Karyorhexis kommt, ist unbekannt. Nach THOMPSON und Mitarbeiter (1969) ist die Pyknose jedoch die häufigste Form des Zelluntergangs. Dies läßt darauf schließen, daß mit der Zahl der Pyknosen in der hier durchgeführten Untersuchung tatsächlich die Zahl der absterbenden Zellen gemessen wird.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß die Verweildauer von Pyknosen in der Krypte, besonders nach einer Bestrahlung, in den vorliegenden Versuchen nicht bekannt ist. In der Literatur gibt es über diese Verweildauer von Pyknosen nur wenig Angaben. So wird von DEVIK (1968, 1971) eine Verweildauer der Pyknose in den Dünndarmkrypten der Maus nach einer Bestrahlung von 200 - 700 rd von 2 - 3 Stunden angegeben, längere Zeiten werden jedoch nicht ausgeschlossen. Bei TSUBOUCHIE und Mitarbeiter (1974) finden sich Hinweise auf eine Halbwertszeit von 2 Stunden oder kürzer nach einer Bestrahlung mit 1000 rd. Auf der anderen Seite ist die Verweildauer der Zellen in der Mitose auch nach der Bestrahlung nicht wesentlich verlängert (0.5 Stunden, vgl. Abschn. D.IV.1.3.). Wenn die Verweildauer der Pyknosen in der Krypte jedoch ungefähr 2 Stunden oder auch mehr beträgt, so führt das dazu, daß im Vergleich zu den Mitosen zuviele Pyknosen gezählt werden. Die absoluten Zahlen von Mitosen und Pyknosen können daher nicht miteinander verglichen werden.

2. Auftreten von Pyknosen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

2.1. Gesamtzahl der Pyknosen pro Krypte

Wie Abb. 7.1. (S. 35) zeigt, ist die Zahl der Pyknosen pro Krypte zwischen der 4. und der 8. Stunde nach Beginn der Doppelmarkierung bei den bestrahlten Tieren deutlich erhöht. Die Anzahl der Pyknosen pro Krypte bei den unbestrahlten Kontrolltieren zeigt, daß auch ohne Bestrahlung ein gewisser Zelluntergang in der Krypte stattfindet. Die Aufschlüsselung nach der unterschiedlichen Markierung der Pyknosen weist darauf hin, daß die Erhöhung der Zahl der Pyknosen im wesentlichen auf Pyknosen der doppelmarkierten, aber auch der unmarkierten Subpopulation beruht. Dies ist auch nicht verwunderlich, da diese beiden Subpopulationen den größten Anteil an der Gesamtpopulation der Krypte haben. Dies läßt aber auch den Schluß zu, daß der pyknotische Zelluntergang nicht durch einen zusätzlichen Strahlenschaden infolge der Markierung mit ^{3}H- und/oder ^{14}C-Thymidin bedingt ist.

2.2. Rein ^{3}H-markierte Pyknosen

Die Zellen der rein ^{3}H-markierten Subpopulation liegen zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung zum größten Teil in der G_2-Phase. Gegenüber den Kontrolltieren werden bei den bestrahlten Tieren mehr rein ^{3}H-markierte Pyknosen gefunden. Ein Vergleich des zeitlichen Auftretens von rein ^{3}H-markierten Mitosen und den entsprechend markierten Pyknosen (Abb. 9.1., S. 62) zeigt, daß beide Kernformen fast gleichzeitig auftreten. Dies läßt darauf schließen, daß die in der G_2-Phase - und eventuell auch in der Mitose - strahlengeschädigten Zellen, die die Teilungsphase nicht durchlaufen können, pyknotisch werden. Nach HURWITZ und Mitarbeitern (1969) entstehen auf diese Weise rund 75 % aller Pyknosen.

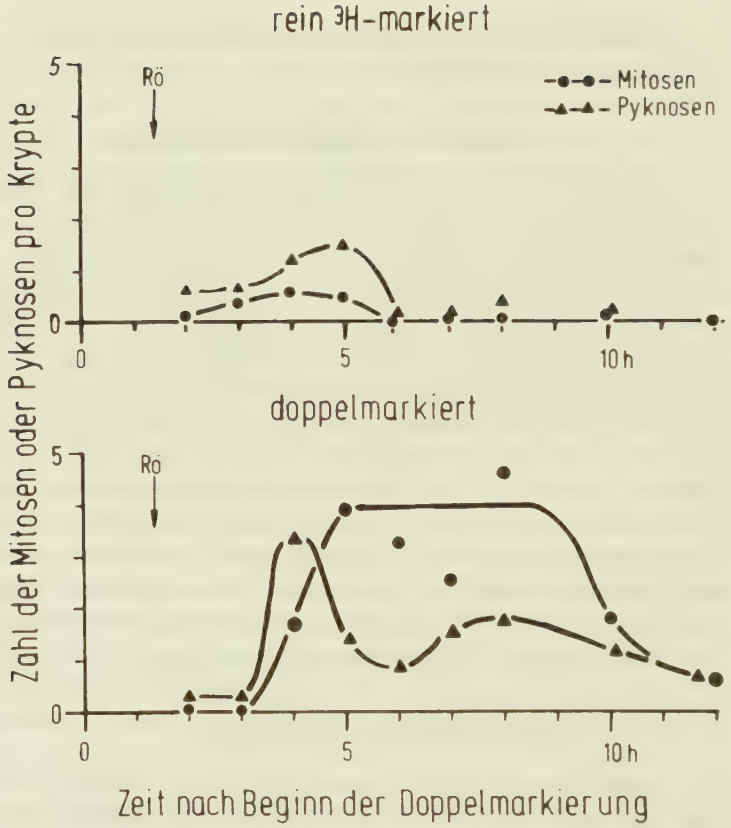


Abb. 9: Zahl der Mitosen und Pyknosen pro Krypte als Funktion der Zeit nach Bestrahlung

9.1.: rein ^{3}H-markierte Mitosen und Pyknosen pro Krypte

9.2.: doppelmarkierte Mitosen und Pyknosen pro Krypte

Die Absolutzahlen von Mitosen und Pyknosen pro Krypte können nicht miteinander verglichen werden (vgl. Abschn. D.V.1., S. 59 f).

2.3. Doppelmarkierte Pyknosen

Die Zellen der doppelmarkierten Subpopulation befinden sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung in der S-Phase. Die Zahl der doppelmarkierten Pyknosen (Abb. 7.3., S. 35) liegt bei den bestrahlten Tieren höher als bei den unbestrahlten Kontrolltieren. Vergleicht man auch hier den zeitlichen Verlauf der Kurven der doppelmarkierten Mitosen und Pyknosen (Abb. 9.2., S. 62), so findet sich wie bei der rein ^{3}H-markierten Subpopulation ein fast gleichzeitiger Anstieg der Mitose- und Pyknosezahlen in der Krypte. Daraus kann geschlossen werden, daß auch in dieser Subpopulation doppelmarkierter Zellen die meisten Pyknosen dadurch entstehen, daß die, hier in der mittleren bis späten S-Phase, strahlengeschädigten Zellen die Mitose nicht mehr zu durchlaufen vermögen.

2.4. Rein ^{14}C- und unmarkierte Pyknosen

Die rein ^{14}C-markierten Zellen befinden sich zum Zeitpunkt der Röntgenbestrahlung in der frühen S-, die unmarkierten Zellen in der G_1-Phase. Bei beiden Subpopulationen treten, wie der Vergleich von Abb. 4.3. (S. 27) mit Abb. 7.4. (S. 35) und von Abb. 4.4. (S. 27) mit Abb. 7.5. (S. 35) zeigt, Pyknosen auf, bevor die Zellen dieser Subpopulationen in die Mitose eingetreten sind. Diese Pyknosen entstehen somit aus Interphasezellen. Allerdings tritt dieser Interphasetod nicht direkt im Anschluß an die Bestrahlung auf.

Soweit das geringe Zahlenmaterial eine Deutung zuläßt, kann zusammenfassend gesagt werden, daß es möglicherweise zwei verschiedene Mechanismen des Zellunterganges nach einer Röntgenbestrahlung gibt. Erfolgt die Strahlenschädigung der Zellen in der G_2- oder der mittleren bis späten S-Phase, so laufen die Zellen offensichtlich bis zur

Mitose weiter. Die Zellen, die die Mitose nicht vollenden können, werden pyknotisch (Mitosetod). Tritt die Strahlenschädigung dagegen in der G_1- oder der frühen S-Phase ein, so kann die Zelle gegebenenfalls schon vor dem Eintritt in die Teilungsphase absterben (Interphasetod).

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Zellzyklusphasen-spezifische Wirkung von Röntgenstrahlen unter in-vivo Bedingungen untersucht. Nach einer Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit 200 rd wurde die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Dünndarmkryptenepithelien in verschiedenen Phasen des Zellzyklus anhand der Mitoseverzögerung und des Auftretens von Pyknosen gemessen.

Die für solche Untersuchungen erforderliche Synchronisation der Zellen wurde in Form einer Pseudosynchronisation durch eine Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin erreicht. Die Injektion von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin in einem Abstand von 1 Stunde führt zu einer rein ^{3}H-markierten Subpopulation in der G_2- und einer rein ^{14}C-markierten Subpopulation am Anfang der S-Phase, deren Zellen kurz nach der Doppelmarkierung jeweils einen Altersunterschied von maximal 1 Stunde aufweisen. Die Zellen in der restlichen S-Phase sind doppelmarkiert, die Zellen in der G_1-Phase sind unmarkiert. Durch diese unterschiedliche Markierung kann die Reaktion von Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in ganz bestimmten Abschnitten des Zellzyklus befinden, untersucht werden. Das Auftreten der unterschiedlich markierten Mitosen als Funktion der Zeit nach Bestrahlung wurde mit den entsprechenden Ergebnissen bei unbestrahlten Tieren verglichen.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, weisen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G_2-Phase befinden, eine mittlere Mitoseverzögerung von 0.8 - 1.2 Minuten pro rd auf. Zellen, die in der S-Phase bestrahlt wurden, zeigen eine mittlere Mitoseverzögerung von 0.5 - 0.6 Minuten pro rd.

Soweit die vorliegenden Ergebnisse eine Deutung zulassen, scheint der Eintritt von Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der frühen S- und der G_1-Phase befinden, in die Mitose nur geringfügig verzögert zu sein.

Die in dieser Arbeit durchgeführten in-vivo Versuche zeigen somit, daß, gemessen an der Mitoseverzögerung, diejenigen Zellen am empfindlichsten auf Röntgenstrahlen reagieren, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G_2-Phase befinden.

Über die gesamte Versuchszeit von 12 Stunden blieb die Gesamtzellzahl pro Krypte auch nach der Bestrahlung mit 200 rd konstant. Dagegen fiel die Zahl der Mitosen pro Krypte innerhalb der ersten Stunde auf 0 ab. Die Zahl der Mitosen erreichte erst nach 5 - 8 Stunden wieder die Durchschnittswerte der unbestrahlten Kontrolltiere.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Dauer der ersten Mitose nach der Bestrahlung nicht wesentlich verlängert ist.

Die Zahl der Pyknosen pro Krypte war nach der Bestrahlung gegenüber den unbestrahlten Kontrolltieren deutlich erhöht. Dabei scheint ein Teil der Zellen, die in der S- und G_2-Phase bestrahlt werden, so strahlengeschädigt zu werden, daß sie zwar den Zyklus bis zur nächsten Mitose noch passieren, die Mitose nun aber nicht mehr regulär durchführen können, sondern pyknotisch werden. Einige Zellen, die in der G_1- und der frühen S-Phase strahlengeschädigt werden, sterben offensichtlich schon in der Interphase ab und erscheinen frühzeitig als Pyknose.

Herrn Professor Dr. A.M. KELLERER möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und seine ständige Gesprächsbereitschaft danken.

Frau Professor Dr. B. MAURER-SCHULTZE und Herrn Professor Dr. W. MAURER gilt mein ganz besonderer Dank. Sie überließen mir das Thema. Ihr ständiger Rat und ihre Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche sowie bei der Abfassung des Manuskripts waren auf Grund ihrer Erfahrung für mich mehr als nur eine Hilfe.

Herrn Dr. V. MÜLLER danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der Autoradiogramme und die ständige Bereitschaft zur Diskussion der Literatur.

Frau G. DUSEL und Herr R. KRUG stellten die Doppelschichtautoradiogramme her, wofür ich ihnen zu großem Dank verpflichtet bin.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

BASLER, U.: Experimentelle Untersuchung zur Zellzyklusphasen-spezifischen Wirkung von Vincristin unter in vivo Bedingungen.
Dissertation Med. Fak. Univ. Würzburg, 1979

BOOTSMA, D.: Changes induced in the first post-irradiation generation cycle of human cells studied by double labelling.
Exp. Cell. Res. 38, 429-431 (1964)

BURHOLT, D.R., B. SCHULTZE, W. MAURER: Autoradiographic confirmation of the mitotic division of every mouse jejunal crypt cell labelled with ^{3}H-Thymidine.
Cell Tissue Kinet. 6, 229-237 (1973)

CAMPLEJOHN, R.S., B. SCHULTZE, W. MAURER: In vivo cell synchrony in the L 1210 mouse leukaemia studied with 5-fluorouracil or 5-fluorouracil followed by cold thymidine infusion.
Br. J. Cancer 35, 546-556 (1977)

CAMPLEJOHN, R.S., B. SCHULTZE, W. MAURER: An in vivo double labelling study of the subsequent fate of cells arrested in metaphase by vincristine in the JB-1 mouse ascites tumour.
Cell Tissue Kinet., im Druck

CARMONA, M.-T., W. KAPPELER, B. SCHULTZE, W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen zur Bestimmung der Verfügbarkeitszeit von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin in den Jejunumkrypten der Maus.
(In Vorbereitung)

DENEKAMP, J.: Changes in the rate of proliferation in normal tissues after irradiation.
In: Radiation Research Biomedical, Chemical and Physical Perspectivs, pp. 810-825,
Academic Press: New York, 1975

DEVIK, F.: Quantitativ cellular aspects of the epithelium in the small intestine of mice following total-body irradiation: cell death, mitosis and chromosomal aberrations.
In: Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation, pp. 531-539,
International Atomic Energy Agency: Vienna, 1968

DEVIK, F.: Intestinal cell kinetics in irradiated mice.
Acta Radiol. Therapy, Physics, Biology 10, 129-149 (1971)

DEWEY, W.C., R.M. HUMPHREY: Relative radiosensitivity of different phases in the life cycle of LP-59 mouse fibroblasts and ascites tumor cells.
Rad. Res. 16, 503-530 (1962)

DEWEY, W.C., R.M. HUMPHREY, B.A. SEDITA: Cell cycle kinetics and radiation induced chromosomal aberrations studied with ^{14}C- and ^{3}H-labels.
Biophys. J. 6, 247-260 (1966)

DOIDA, Y., S. OKADA: Radiation induced mitotic delay in cultured mammalian cells (L 5178Y).
Rad. Res. 38, 513-529 (1969)

ELKIND, M.M., G.F. WHITMORE: The radiobiology of cultured mammalian cells.
Gordon and Breach Science Publishers: New York, 1967

FROESE, G.: Division delay in HeLa cells and chinese hamster cells. A time lapse study.
Int. J. Rad. Biol. 10, 357-367 (1966)

GEDIGK, P., V. TOTOVIĆ: Zell- und Gewebsschäden.
In: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie (M. EDER und P. GEDIGK, Hrsg.),
Springer Verlag: Berlin - Heidelberg - New York, 1974

HAACK, V.: Autoradiographische Untersuchung zur Zellkinetik in den Krypten des Jejunums der Maus.
Dissertation Med. Fak. Univ. Würzburg, 1972

HURWITZ, C., L.J. TOLMACH: Time-lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S3 cells.
I. Cell progression and cell desintegration.
Biophys. J. 9, 607-633 (1969)

JELLINGHAUS, W., R. MAIDHOF, B. SCHULTZE, W. MAURER: Experimentelle Untersuchungen und zellkinetische Berechnungen zur Frage der Synchronisation mit Vincristin in vivo (Mäuse-Leukämie L 1210, Kryptenepithelien der Maus).
Z. Krebsforsch. 84, 161-176 (1975)

JELLINGHAUS, W., R. MAIDHOF, B. SCHULTZE, W. MAURER: Experiments and theoretical considerations on synchronisation of L 1210 ascites tumour cells and crypt epithelia of the mouse with Vincristine.
Chemotherapy 8, 31-36 (1976)

KORR, H.: Proliferation of different cell types in the brain.
Adv. Anat. Embryol. Cell Biol., vol. 62 (im Druck)

LAFONTAINE, N., H. FIRKET: Variations, en fonction du cycle cellulaire, du délai mitotique induit par irradiation de cultures BHK 21.
Int. J. Radiat. Biol. 6, 607-611 (1972)

LEEPER, D.B., M.H. SCHNEIDERMAN, W.C. DEWEY: Radiation induced division delay in synchronized chinese hamster ovary cells in monolayer culture.
Rad. Res. 50, 401-417 (1972)

LESHER, S., L.F. LAMERTON, G.A. SACHER, R.J.M. FRY, G.G. STEEL, P.J. ROYLANCE: Effects of continous gamma irradiation of the generation cycle of the duodenal crypt cells of the mouse and rat.
Rad. Res. 29, 57-70 (1966a)

LESHER, S.: Effects of single-dose, whole-body irradiation on the mouse duodenal crypt cells.
Excerpta Medica Monographs on Nuclear Medicine and Biology No. 1, Gastrointestinal Radiation Injury, pp. 103-110, 1966b

LESHER, S., G.A. SACHER: Changes in cell proliferation produced by 12 roentgens of 60-Co gamma irradiation per day in the intestinal crypt cells of 100-, 400- and 825-day-old BCF_1 mice.
Rad. Res. 30, 654-662 (1967a)

LESHER, S.: Compensatory reactions in intestinal crypt cells after 300 roentgens of cobalt-60 gamma irradiation.
Rad. Res. 32, 510-519 (1967b)

LESHER, S., J. BAUMANN: Recovery of reproductive activity and the maintenance of structural integrity in the intestinal epithelium of the mouse after single-dose whole-body 60-Co-gamma-ray-exposures.
In: Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation, pp. 507-513,
Int. Atomic Energy Agency: Vienna, 1968

LESHER, S., J. LESHER: Effects of single-dose, whole-body, 60-Co gamma irradiation on the number of cells in DNA synthesis and mitosis in the mouse duodenal epithelium.
Rad. Res. 43, 429-438 (1970)

LESHER, S., J. LESHER: Effects of single-dose, partial-body X-irradiation on cell proliferation in the mouse small intestinal epithelium.
Rad. Res. 57, 148-157 (1974)

LESHER, S., J. COOPER, R. HAGEMANN, J. LESHER: Proliferation patterns in the mouse jejunal epithelium after fractionated abdominal X-irradiation.
Current Topics in Radiation Research Quarterly 10, 229-261 (1975)

MAK, S., J.E. TILL: The effects of X-rays on L-cells through the cell cycle.
Rad. Res. 20, 600-618 (1963)

OKADA, S.: Radiation effects on cell progress through life cycle. Immediate effect of radiation on cell progress.
In: Radiation Biochemistry (K.J. ALTMAN, G.B. GERBER, S. OKADA, eds.), pp. 191-239,
Academic Press: New York and London, 1970

QUASTLER, H., F.G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res. 17, 420-438 (1959)

SINCLAIR, W.K.: Radiation effects on mammalian cell populations in vitro.
In: Proceedings of the Third International Congress of Radiation Research, Cortina, 1966, pp. 607-631, North-Holland Publishing Co.: Amsterdam, 1967

SINCLAIR, W.K.: Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro.
Rad. Res. 33, 620-643 (1968)

SCHULTZE, B., V. HAACK, A.C. SCHMEER, W. MAURER: Autoradiographic investigation on the cell kinetics of crypt epithelia in the jejunum of the mouse.
Cell. Tissue Kinet. 5, 131-145 (1972)

SCHULTZE, B., MAURER, W., H. HAGENBUSCH: A two emulsion autoradiographic technique and the discrimination of three different types of labelling after double labelling with ^{3}H- and ^{14}C-thymidine.
Cell Tissue Kinet. 9, 245-255 (1976)

SCHULTZE, B., A.M. KELLERER, W. MAURER: Transit times through the cycle phases of jejunal crypt cells of the mouse. Analysis in terms of the mean values and the variances.
Cell Tissue Kinet. 12, 347-359 (1979)

SPEAR, F.G., A. GLÜCKSMANN: The effects of gamma irradiation on cells in vivo.
Brit. J. Radiol. 11, 533-553 (1938)

TERASIMA, T., L.J. TOLMACH: Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle.
Biophys. J. 3, 11-33 (1963)

THOMPSON, L.H., H.D. SUIT: Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L-cells studied with time-lapse photography II.
Int. J. Rad. Biol. 15, 347-362 (1969)

TOLMACH, L.J., B.G. WEISS, L.E. HOPWOOD: Ionizising radiation and the cell cycle.
Fed. Proceedings 30, 1742-1751 (1971)

TSUBOUCHIE, S., T. MATSUZAWA: Rapid radiation cell death and cell proliferation in the intestinal epithelium after 1000 - rad irradiation.
Rad. Res. 57, 451-458 (1974)

WIMBER, D.E., H. QUASTLER, O.L. STEIN, D.R. WIMBER: Analysis of tritium incorporation into individual cells by autoradiography of squash preperations.
J. of Biophysical and Biomedical Cytology 8, 327-331 (1960)

L E B E N S L A U F

Am 6. November 1952 wurde ich als viertes Kind des kaufmännischen Angestellten Karl Klein und seiner Ehefrau Annegret Klein, geborene Sickenberger, in Aschaffenburg geboren.

Im September 1959 wurde ich in die Volksschule Aschaffenburg-Damm eingeschult und trat im Herbst 1963 in das Kronberg-Gymnasium Aschaffenburg über. 1972 legte ich dort meine Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im August 1974 setzte ich das Klinische Studium an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg fort. Hier legte ich am 22.5.1979 den 3. Teil der Ärztlichen Prüfung ab und erhielt am 25.5.1979 vom Bayerischen Staatsministerium des Innern die Approbation.

Seit Juli 1979 leiste ich meine Wehrpflicht als Stabsarzt der Bundeswehr in Kassel und Hammelburg ab.

Seit 8. September 1979 bin ich mit der medizinisch-technischen Assistentin Elisabeth Klein, geborene Becker, verheiratet.

Meine experimentelle Doktorarbeit begann ich im Oktober 1975 bei Frau Professor Dr.med. Maurer-Schultze am Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg.

Würzburg, den 31. Januar 1980

Manfred Klein.

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80